

dc\_341\_11

**Akadémiai Doktori Értekezés**

**A CUCUMOVÍRUSOK  
KÓRTANI VÁLTOZÉKONYSÁGA**

**Salánki Katalin**

**Gödöllő, 2012**

## TARTALOMJEGYZÉK

|  |    |
|--|----|
| 1. BEVEZETÉS   | 4  |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS   | 6  |
| 2. 1. A cucumovírusok jelentősége  | 6  |
| 2. 2. A cucumovírusok jellemzése   | 9  |
| 2. 2. 1. Genomszerveződés és fehérjeexpresszió   | 10 |
| 2. 2. 1. 1. Az 1a fehérje  | 12 |
| 2. 2. 1. 2. A 2a fehérje   | 13 |
| 2. 2. 1. 3. A 2b fehérje   | 14 |
| 2. 2. 1. 4. A 3a fehérje   | 16 |
| 2. 2. 1. 5. A 3b fehérje   | 18 |
| 2. 2. 2. A vírus-gazdanövény kapcsolatok   | 20 |
| 2. 2. 3. A cucumovírusok csoportosítása  | 21 |
| 2. 2. 3. 1. Az uborka mozaik vírus izolátumok csoportosítása   | 21 |
| 2. 2. 3. 2. A földimogyoró satnyulás vírus izolátumok csoportosítása és evolúciója   | 22 |
| 2. 2. 3. 3. A paradicsom magtalanság vírus izolátumok  | 23 |
| 2. 3. A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus  | 24 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK  | 27 |
| 3. 1. Vegyszerek, enzimek, kiték   | 27 |
| 3. 2. Növények   | 27 |
| 3. 3. Baktériumtörzsek   | 27 |
| 3. 4. Vírus izolátumok   | 28 |
| 3. 5. Növények inokulálása   | 29 |
| 3. 6. Oligonukleotid primerek  | 29 |
| 3. 7. Vírustisztítás és nukleinsav kivonás levélszövetből  | 32 |
| 3. 8. A vírus RNS polyadenilálása  | 32 |
| 3. 9. Fertőzőképes vírusklónok   | 32 |
| 3. 10. A vírus RNS-ek molekuláris klónozása, plazmidkonstrukciók elkészítése   | 33 |
| 3. 10. 1. Trk7-CMV és R-CMV RNS3 rekombináns és mutáns klónok készítése a törpüléssel járó tünetek meghatározásához        | 33 |
| 3. 10. 2. Rekombináns és mutáns R-CMV RNS3 klónok készítése a hosszú távú mozgásban kulcsfontosságú régió meghatározásához | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 3. 10. 3. Rekombináns CMV-TAV RNS3 klónok készítése MP-CP kompatibilitási vizsgálatokhoz                                 | 34 |
| 3. 10. 4. Rekombináns CMV-CymRSV RNS3 klónok készítése a heterológ MP szerepének meghatározásához                        | 35 |
| 3. 10. 5. Ns-CMV és Rs-CMV RNS1 rekombináns klónok készítése   | 35 |
| 3. 11. Inokulálás fertőzőképes klónokkal   | 36 |
| 3. 11. 1. Növények inokulálása   | 36 |
| 3. 11. 2. Protoplaszt inokulálás   | 36 |
| 3. 12. A vírusfertőzés detektálása   | 37 |
| 3. 12. 1. RT/PCR detektálás  | 37 |
| 3. 12. 2. Northern analízis  | 37 |
| 3. 12. 3. Western blot analízis  | 38 |
| 3. 12. 4. Press blott hibridizáció   | 38 |
| 3. 13. Nukleinsav szekvenciák meghatározása  | 38 |
| 3. 14. Bioinformatikai vizsgálatok   | 39 |
| 3. 14. 1. Nukleinsav sorrendek összehasonlítás és filogenetikai elemzése   | 39 |
| 3. 14. 2. Rekombinációs vizsgálatok  | 39 |
| 3. 14. 3. Homológia modellezés, elektrosztatikus potenciál számítás  | 39 |
| 4. EREDMÉNYEK  | 41 |
| 4. 1. CMV által indukált törpülés <i>Nicotiana glutinosa</i> -n  | 41 |
| 4. 1. 1. Tünettani vizsgálatok   | 41 |
| 4. 1. 2. A törpülés tünet kialakításának genetikai háttere   | 42 |
| 4. 1. 3. A vírusfertőzés kinetikájának és a vírus akkumulációjának vizsgálata  | 43 |
| 4. 1. 4. A 193-as aminosav jóslott funkciója a köpenyfehérje szerkezeti vizsgálatok alapján                              | 46 |
| 4. 2. A cucumovírusok hosszú távú mozgásában kulcsfontosságú köpenyfehérje régió azonosítása uborka növényeken           | 49 |
| 4. 2. 1. Tünettani megfigyelések és rekombináns vírusok vizsgálata   | 49 |
| 4. 2. 2. A köpenyfehérje hurokrégióinak vizsgálata   | 50 |
| 4. 2. 3. A $\beta$ B- $\beta$ C hurok részletes vizsgálata   | 52 |
| 4. 3. A cucumovírusok sejtről-sejtre történő terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása | 55 |
| 4. 3. 1. Rekombináns köpenyfehérjét és mozgási fehérjét kódoló RNS3 klónok készítése                                     | 56 |
| 4. 3. 2. A rekombináns vírusok vizsgálata <i>Nicotiana clevelandii</i> protoplaszt rendszerben                           | 58 |

|   |     |
|---|-----|
| 4. 3. 3. A rekombináns MP-t hordozó vírusok vizsgálata növényeken   | 59  |
| 4. 3. 4. Köpenyfehérje szerkezeti vizsgálatok   | 61  |
| 4. 4. Heterológ mozgási fehérje jelentősen módosíthatja a CMV-re jellemző tüneteket   | 64  |
| 4. 4. 1. A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus mozgási fehérjéjét hordozó rekombináns vírus készítése, a rekombináns vírus fertőzőképességének vizsgálata | 64  |
| 4. 4. 2. A rekombináns vírus tünettani jellemzése   | 66  |
| 4. 5. A Pannon ökorégióban előforduló PSV izolátumok jellemzése   | 71  |
| 4. 5. 1. Az Rp-PSV nukleotid sorrendjének meghatározása, filogenetikai és rekombinációs elemzése  | 71  |
| 4. 5. 2. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok jellemzése  | 75  |
| 4. 5. 2. 1. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok nukleotid sorrendjének jellemzése és filogenetikai vizsgálata                                | 75  |
| 4. 5. 2. 2. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok tünettani jellemzése   | 77  |
| 4. 6. Egy különleges patotípusú CMV, az Ns-CMV vizsgálata   | 81  |
| 4. 6. 1. Tünettani vizsgálatok  | 81  |
| 4. 6. 2. A nekrotikus tulajdonság genetikai hátterének vizsgálata   | 82  |
| 4. 6. 3. Az 1a fehérje 461-es pozíciójának részletes vizsgálata   | 85  |
| 4. 6. 4. Strukturális változások az 1a fehérjében a különböző mutációk hatására   | 92  |
| 5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA   | 94  |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS  | 111 |
| 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK   | 113 |
| 8. IRODALOMJEGYZÉK  | 115 |
| 9. KÖZLEMÉNYEK  | 133 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS   | 142 |

## 1. BEVEZETÉS

A növényi vírusok gazdasági jelentősége felbecsülhetetlen, egyes szerzők szerint a mezőgazdaságban bekövetkezett termésveszteség és minőségromlás feléért is felelőssé tehető. Évről évre újabb vírusok kerülnek azonosításra, sőt a technikai lehetőségek fejlődésével ma már olyan vírusokat is azonosítanak, melyek látható tüneteket nem okoznak. A már régóta ismert vírusok is folyamatosan változnak, megújulnak. A környezeti viszonyokhoz történő alkalmazkodás során újabb, korábban nem fertőzött területeken jelenhetnek meg adott vírusok, illetve a korábban is jelenlévő vírusok új variánsai kerülhetnek előtérbe például a magasabb hőmérséklethez történő alkalmazkodás során. A globalizációs folyamatok és a nem mindig megfelelő karantén viszonyok is hozzájárulhatnak a korábban egy adott régióra nem jellemző vírusok megjelenéséhez, amik a már jelenlévő vírusokkal versenyezhetnek, de akár szinergizmus révén a korábbinál súlyosabb járványokat is kialakíthatnak. A vírusok elleni védekezési stratégiák kialakításában fontos szerepet játszik rezisztencia gének beépítése a termesztésbe vont fajtákba. Ezek a rezisztencia gének általában csak időleges megoldást jelentenek a vírushatással szemben, és előbb-utóbb megjelennek a rezisztenciát áttörő vírustörzsek, majd ezek idővel dominánssá is válhatnak a víruspopulációban. Ezeknek a mutánsoknak az eredete mindig kétséges, kialakulhatnak a korábban jelenlévő víruspopulációból mutációval, illetve rekombinációval, esetleg a termőföldeket körülvevő természetes ökoszisztémában korábban is jelenlévő, de addig nem domináns izolátum is előtérbe kerülhet.

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) minden szempontból az egyik legsikeresebb vírus. Gyakorlatilag nincs olyan terület a világon ahol mezőgazdasági termelés folyik és a CMV ne fordulna elő, megtalálható trópusi területektől egészen az északi vidékekig. A CMV gazdanövény spektruma hihetetlenül széles, mind egyszikű mind kétszikű növényekről leírták, éppúgy megtalálták lágyszárú, mint fás növényeken. A különböző izolátumai ugyanazon a gazdanövényen is a legváltozatosabb tüneteket alakíthatják ki, az egész súlyos, a növény pusztulását okozó nekrozistól

az alig látható halvány mozaikig széles skálán mozognak a megfigyelt betegségtünetek. Természetes ökoszisztémákból is a legváltozatosabb növényeken azonosították a CMV-t. Ugyanakkor a vele legszorosabb rokonságban levő, felépítésében és működésében hozzá nagyon hasonló paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV) és a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) messze nem tekinthető ilyen sikeres vírusnak, elterjedésük és gazdasági jelentőségük lényegesen szűkebb.

Az elmúlt két évtizedben a molekuláris biológia módszertanának fejlődése megteremtette a lehetőségét annak, hogy a korábban leírt változatos patológiai jellemzők kialakulásának okait megpróbáljuk feltárni, megtegyük az első lépéseket afelé, hogy megérthessük azt, hogy egy igen egyszerű, csupán öt fehérjét kódoló örökítőanyag fehérjeburokba csomagolva hogyan képes drasztikus betegségtünetek kialakítására.

Munkám során az egyik legrégebben felfedezett és legváltozatosabb növényi vírushoz az uborka mozaik vírushoz és rokon vírusaihoz kapcsolódó munkáimat foglaltam össze. Különböző CMV izolátumokkal dolgoztam, melyek között szerepelt dr. Beczner László által az 1970-es évek végén gyűjtött izolátum (Trk7-CMV) éppúgy, mint az 1990-es években izolált, a világon leelterjedtebb izolátumokhoz hasonló tüneteket mutató izolátum (Rs-CMV), illetve egyedi patológiai jellemzőkkel rendelkező izolátum (Ns-CMV) is. Kísérleteinkbe szintén bevontuk a két legközelebbi rokon vírust, a TAV-ot és a PSV-t. Megpróbáltunk hozzájárulni annak megértéséhez, hogy a betegségtünetek és a gazdanövénykör változatosságának meghatározását illetve ehhez kapcsolódóan a vírusok változatosságát és változékonyságát milyen tényezők befolyásolhatják.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) névadója a négy tagot számláló *Cucumovirus* nemzetségnek, ahová a CMV-n kívül a paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV), a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) és az utóbbi időben füzéres díszcsorbáról leírt *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV) (Ian és mtsai., 2009) tartozik. A *Cucumovirus* nemzetség az *Alfamo*-, *Ilar*-, *Bromo*- és *Oleavirus* nemzetségekkel alkotja a *Bromoviridae* családot, mely számos más víruscsaláddal együtt a *Nidovirales* rend tagja (Roossinck és mtsai., 1999a).

### 2. 1. A cucumovírusok jelentősége

Az uborka mozaik vírus egyike a legrégebben ismert növényi vírusoknak. Az Egyesült Államokban 1916-ban írták le először sárgadinnyéről (Doolittle, 1916) illetve uborkáról (Jagger, 1916). Az azóta eltelt években a világ szinte minden országában megtalálták, mind mérsékelt égövi, mind trópusi területeken. A CMV szélsőségesen polifág, az összes ismert vírus közül a CMV rendelkezik a legszélesebb gazdanövénykörrel, mintegy 85 családból több mint 1000 növényfajról írták le (Douine és mtsai., 1979; Edwardson és Christie, 1991) és ez a szám folyamatosan növekszik.

A CMV a termesztett növénykultúrák, különösen a zöldségnövények egyik legjelentősebb víruskórokozója (Tomlinson, 1987), de a dísznövénytermesztésben is komoly károkat okoz (Flasinski és mtsai., 1995). Súlyos járványokat is okozhat, például leírtak a CMV által okozott paradicsom nekrozis járványt Franciaországban, Olaszországban és Japánban, banánültetvények mozaikosságát Marokkóban és Közép-Amerikában, vagy az édesburgonya mozaikosságát Izraelben (összefoglaló: Palukaitis és mtsai., 1992). A CMV hazánkban is az egyik legrégebben leírt (Szirmai, 1941) és gazdaságilag is az egyik legjelentősebb növényi vírus (Horváth és Beczner, 1983), ezért az ellene való védekezést mindig aktuális feladatként kell kezelnünk (Gallitelli, 2000).

A CMV fertőzés okozta tünetek igen változatosak lehetnek, ami nagymértékben függhet a vírusizolátumtól, illetve a gazdanövénytől. A leggyakoribb tünetei a levelek mozaikossága, esetleg deformációja (1. A ábra). Paradicsom növény esetén tipikus tünet a levelek elkeskenyedése, az ún. páfránylevelűség (1. B ábra). A leveleken megfigyelhetünk nekrotikus foltokat is (1. C ábra), de terméseken is okozhat tüneteket (1. D ábra). Igen látványos cirmosságot is okozhat különböző növények virágjain (1. E ábra).



**1. ábra** A CMV fertőzés tünetei: A: cukorrépa, B: paradicsom, C: paprika növény, D: paprika bogyó, E: ibolya

Laboratóriumi körülmények között könnyűszerrel jellemezhetők egy-egy CMV izolátum patológiai sajátosságai, a természetben azonban gyakran nem tiszta CMV fertőzéssel találkozunk. A vírust sok esetben kevert fertőzésekkel izolálják, ilyenkor az eredő tünet súlyosabb lehet, mint az együttesen fertőző



vírusok tüneteinek önmagukban. Jól ismert példa a CMV tüneteinek súlyosbodása Potyvírusok jelenlétében, amit a két vírus szinergizmusa okoz (Pruss és mtsai., 1997; Wang és mtsai., 2002).

Míg a CMV gazdanövényköre és elterjedése a növényi vírusok között szokatlanul széles, addig a PSV és a TAV gazdanövényköre lényegesen szűkebb. A PSV természetes körülmények között elsősorban a *Leguminosae*, *Chenopodiaceae* és *Solanaceae* családba tartozó növényeket fertőzi, a TAV pedig főleg a *Chenopodiaceae*, *Compositae* és *Solanaceae* családba tartozó fajokon található meg (Kaper és Waterworth, 1981). A PSV fertőzésnek komoly gazdasági jelentősége a földimogyoró termesztésben van, míg a TAV fertőzés a krizantém termesztésben okoz komoly problémákat (Kaper és Waterworth, 1981). Hazánkban a PSV az akác legfontosabb vírus eredetű kórokozója (2. ábra).



2. ábra PSV tünete fehér akác levelén (Fotó: Kiss László)

Mindhárom vírust főleg rovarvektorok terjesztik. Legalább 75 levéltetű fajról bizonyították, hogy terjeszthetik a cucumovírusokat (Fritzsche és mtsai., 1972), legfontosabb ezek közül a *Myzus persicae* és az *Aphis gossypii*. Mind a három vírus mechanikai úton is átvihető, így fóliás termesztésben is komoly károkat okozhatnak. Számos esetben figyeltek meg magátvitelt is, így a vetőmagtermesztés nemzetközivé válása a vírus terjedésének újabb lehetőségét hozta. A vírus magon belüli lokalizációja csak néhány esetben ismert, például a

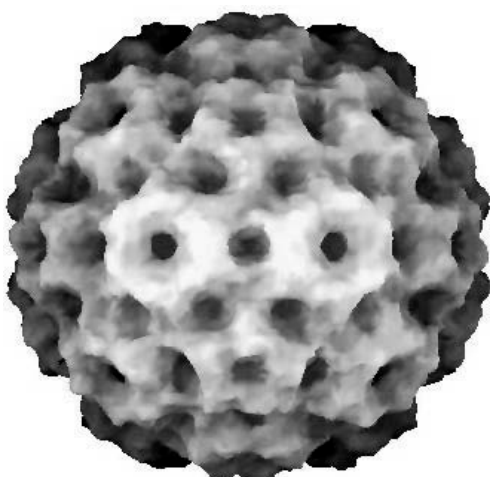
tyúkhúr (*Stellaria media*) esetében az embrióban, míg a vad uborkánál (*Echinocystis lobata*) az endospermiumban található (Palukaitis és mtsai., 1992). A gyommagvakkal történő magátvitel jelentősége igen nagy, mivel gyakran a gyommagvakban áttelelő vírus jelenti a következő évben a természetes fertőzés forrását.

## 2. 2. A cucumovírusok jellemzése

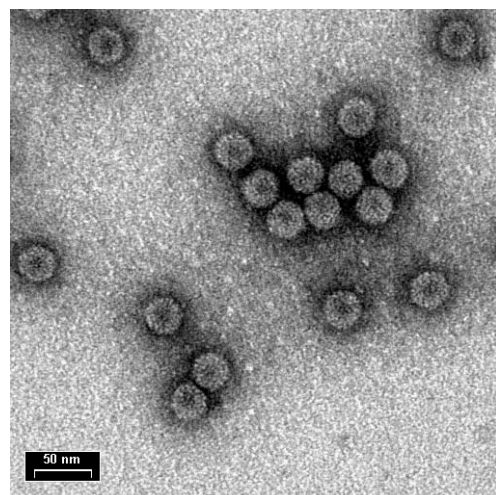
Mind a négy cucumovírusnak hasonló a morfológiája és a genomszerveződése, azonban jól elkülöníthetők egymástól szerológiai tulajdonságaik és nukleinsav sorrendjük alapján (Kaper és Waterworth, 1981, Diaz-Ruiz és Kaper, 1983).

A cucumovírusok részecskéinek fizikai tulajdonságai rendkívül hasonlóak a *Bromoviridae* család más tagjaihoz. A virion mintegy 29 nm átmérőjű, csonkolt csúcsú ikozaéder alakú (3. A ábra). A kapszidot 180 egyforma köpenyfehérje alegység alkotja (Finch és mtsai., 1967), a víruspartikulumok belsejében megfigyelhető elektrondenz állomány a vírus genetikai anyaga, de rendezetlensége miatt a vírusrészecske röntgendiffrakciós szerkezetében az RNS molekulák atomi felbontású szerkezete nem határozható meg (3. B ábra).

A



B



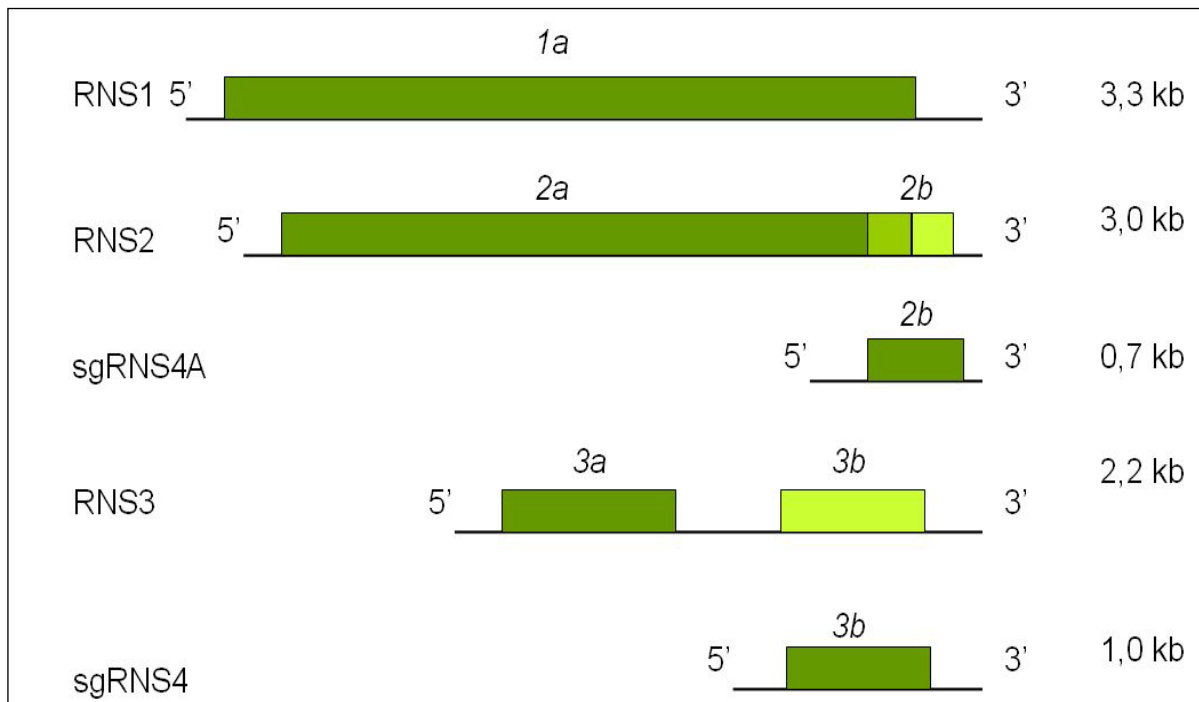
**3. ábra** A: Az uborka mozaik vírus morfológiája krio-elektronmikroszkópiával nyert adatok alapján B: Negatívan festett CMV virionok elektronmikroszkópos preparátumon (Fotó: dr. Szabó László).

A genomi RNS elektrosztatikus kölcsönhatással kötődik a kapszidhoz. A vírusrészecskét is elektrosztatikus kölcsönhatások tartják össze, ezért a virion szerkezete könnyen megbontható gyenge detergenssekkel, vagy nagy koncentrációjú sóoldatokkal. A köpenyfehérje alegységek laza illeszkedése a vírust érzékennyé teszi ribonukleázok hatásaira is. A 180 köpenyfehérjéből álló vírusrészecskét 60 darab kvázi háromfogású szimmetria tengely menti konformációjukban kicsit eltérő köpenyfehérjék trimerje (A, B és C) építi fel (Finch és mtsai., 1967; Smith és mtsai., 2000).

### 2. 2. 1. Genomszerveződés és fehérjeexpresszió

A *Bromoviridae* család többi tagjához hasonlóan a cucumovírusok örökítő anyaga is három, egyszálú, mRNS orientációjú RNS molekulákból áll (4. ábra), melyek hossza 3,36; 3,05 és 2,22 kb. Az egyes és kettes genomi RNS-ek külön-külön vírusrészecskébe csomagolódnak, míg a hármas RNS a szubgenomi négyes RNS-sel csomagolódik egy víruspartikulumba (Lot és Kaper, 1976). Mindegyik RNS 5' végén az eukarióta mRNS-ekre jellemző 7-metilguanozin sapka található (Symons, 1975). A 3' végek erősen konzervált szekvenciamotívuma magnézium ionok jelenlétében tRNS-szerű másodlagos szerkezetet vesz fel (Joshi és mtsai., 1983; Rietveld és mtsai., 1983) és a CMV esetében acetilálódhat (Kohl és Hall, 1974), míg a TAV-nál ez nem fordul elő (Joshi és Haenni, 1986). Ez a struktúra a vírus replikációjánál az antiszenz RNS szál promóteréül szolgál (Sivakumaran és mtsai., 2000).

A cucumovírusok genomja összesen öt fehérjét határoz meg, az RNS1-en egy, az RNS2 és 3 molekulákon 2-2 gént találunk. A bicisztronikus RNS-ek 3' végén elhelyezkedő *2b*, illetve *3b* gének azonban nem közvetlenül a genomi RNS-ekről, hanem az azokról szintetizálódó szubgenomi RNS4A illetve RNS4 molekulákról transzlálódnak (4. ábra). A *2b* gén érdekessége hogy 5' régiója átfed a *2a* fehérjét kódoló rész 3' végével, de nincsenek egy leolvasási keretben. Míg az RNS4A 0,7 kb hosszúságú, az RNS4 hossza 1,0 kb.



#### 4. ábra A cucumovírusok genomszerveződése

Nem lenne teljes a cucumovírusok genomszerveződéséről alkotott kép a szatellit RNS-ek említése nélkül. Ezek a 330-380 nukleotid hosszúságú lineáris RNS molekulák nem szükségesek sem a CMV replikációjához, sem a sikeres fertőzéshez, időnként mégis előfordulhatnak a virionban a vírus RNS-eivel „egybecsomagolva”. A vírus RNS-sel nukleinsav sorrend homológiát nem mutatnak. Önálló replikációra és enkapszidációra képtelenek, fehérjét nem kódolnak, ezért szaporodásukhoz és terjedésükhöz a CMV fehérjéit veszik igénybe (Mossop és Francki, 1978). Különös jelentőségüket az adja, hogy gyökeresen képesek a „gazda” (helper) CMV törzs tüneteit módosítani, nagymértékben súlyosbítani vagy akár enyhíteni is (Escriu és mtsai., 2000; Stommel és mtsai., 1998).

A cucumovírusoknál a három különálló genomi RNS felcserélésével, úgynevezett reassortáns vírusokat készíthetünk. Míg az RNS3 szabadon cserélhető a különböző cucumovírusok közt, addig az RNS1 és 2 nem. A CMV és a PSV esetében Masashi és mtsai. (2003) élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával bizonyították, hogy az 1a fehérje C-terminális régiójának kapcsolatba kell lépnie a 2a fehérje N-terminális régiójával ahhoz, hogy az RNS replikáció elindulhasson.

Különböző cucumovírusok esetén feltehetőleg ez a kapcsolat nem tud kialakulni, ezért nem alakulhat ki közöttük RNS1, 2 reasszortáns vírus.

### 2. 2. 1. 1. Az 1a fehérje

Az RNS1-ről transzlálódó 1a fehérje a cucumovírusok leghosszabb fehérjéje, megközelítőleg 990-1007 aminosav hosszúságú. Az 1a fehérje a CMV replikáz complex egyik alkotóeleme (Hayes és Buck, 1990), amely a tonoplast membránján lokalizálódik (Cillo és mtsai., 2002). Aminosav sorrendjének számítógépes analízisével két fő domént sikerült azonosítani. Az N-terminális régióban nukleotidkötő, illetve metiltranszferáz aktivitással rendelkező fehérjékre jellemző konzervált motívumot (Gorbalenya és mtsai., 1988; Rozanov és mtsai., 1992) írtak le. A fehérje metiltranszferáz aktivitásának feltehetőleg a genomi és szubgenomi RNS-ek CAP strukturájának kialakításában van szerepe. Dohány növényben az 1a fehérje metiltranszferáz régiójával közvetlen kapcsolatba lép a *Tcoi2* elnevezésű fehérje kináz, aminek szabályozó szerepe valószínűsíthető (Kim és mtsai., 2006). A C-terminális részen a vírus eredetű helikázokra jellemző szekvenciaelemeket azonosítottak (Gorbalenya és mtsai., 1989). A helikáz jellegű motívumok közé tartozik két nukleotid trifoszfát (NTP) kötő régió, valamint egy adenozin trifoszfátáz (ATPáz) és feltehetően egy RNS kötő aktivitású motívum. Ezen régiók hiánya a replikáció gátlását eredményezi (Gorbalenya és mtsai., 1989; Kadaré és Haenni, 1997).

Az 1a fehérje pontos térszerkezete még nem ismert, de feltételezik, hogy két globuláris részt egy flexibilis, prolingazdag régió választja el egymástól (O'Reilly és mtsai., 1995)

Az 1a fehérjéről vírusreplikációban betöltött elsődleges szerepén kívül bizonyították, hogy szerepe van a vírus növényen belüli terjedésének sebességének meghatározásában (Roossinck és Palukaitis, 1990), ami azonban független a vírus replikációjának sebességétől (Gal-on és mtsai., 1994). Kimutatták még az 1a fehérje szerepét a szatellit RNS-ek replikálásának képességében az *Ixora*-CMV törzsnél (McGarvey és mtsai., 1995), az *Sny*-CMV törzsnél ugyanezt a tulajdonságot az 1a fehérje egyetlen aminosavára térképezték (Roossinck és mtsai.,

1997). Bab növényeknél a maggal történő átvihetőségért szintén az RNS1, és így feltehetőleg az 1a fehérje felelős (Hampton és Francki, 1992).

CMV RNS1-gyel transzgenikus dohány növényeket is készítettek. Ezekben, az RNS1-et expresszáló növényekben homológ vírusfertőzés esetén a vírus hosszú távú mozgása gátolt, bár replikációjának hatékonysága protoplaszt rendszerben a nem transzgenikus növényekkel megegyező. Ezekben a növényekben a vírus terjedésének gátlása azzal függ össze, hogy nem képes a növény szállítószövet rendszerébe, a floémbe bejutni a vírus (Canto és Palukaitis, 2001).

### 2. 2. 1. 2. A 2a fehérje

A különböző cucumovírusoknál a 2a fehérje hozzávetőleg 830-858 aa hosszúságú és 94-97 kDa molekulatömegű. A 2a fehérje az RNS2-ről képződik. Minden esetben azonosítható rajtuk az RNS függő RNS polimerázok jellegzetes  $Mg^{2+}$ -kötő GDD motívuma (Argos, 1988). Ezen motívum, valamint a fehérje más részeinek szekvencia analízise alapján a 2a fehérje a CMV RNS polimeráza (Kamer és Argos, 1984). Nitta és mtsai. (1988) megállapították, hogy az RNS2 hiányában dohány protoplasztokban CMV replikáció nem történik. A replikáz komplex alkotórészeként a vírus tisztított replikáz komplexe is tartalmazza a 2a fehérjét (Hayes és Buck, 1990). A vírus RNS pozitív szálának szintézisére a 2a fehérje önmagában is képes, azonban a negative szál szintéziséhez az 1a fehérje jelenléte is szükséges (Seo et al 2009).

Igazolták, hogy a 2a fehérje az 1a fehérjénél nagyobb mennyiségben van jelen a fertőzött növényi szövetekben (Gal-On és mtsai., 1994; Hellwald és Palukaitis, 1995). A CMV 2a fehérje *in vivo* elsősorban a tonoplaszt membránon lokalizálódik, azonban jelentős mennyiségű foszforilált 2a fehérje jelenléte a citoplazmából is kimutható (Cillo és mtsai., 2002; Gal-On és mtsai., 2000).

A replikáz complex kialakulása során a növényi sejtben először az 1a fehérje kötődik a tonoplaszt membránhoz, majd a 2a fehérje az 1a fehérjéhez kapcsolódik. Az 1a fehérjével történő kapcsolódáshoz elegendő a 2a fehérje N-terminális régiójának első 126 aminosava, viszont ha ez a rész foszforilált állapotban van, a fehérje komplex nem jön létre, és a 2a fehérje a továbbiakban a

citoplazmában lokalizálódik (Kim és mtsai., 2002). Így a 2a foszforiláltsági szintje befolyásolja a fehérje sejten belüli lokalizációját, és ezen keresztül valószínűleg funkcióját is (Kim és Palukaitis, 1997).

A vírus patológiai jellemzőinek meghatározásában is több esetben bizonyították a 2a fehérje szerepét. Több CMV izolátum esetén bizonyították, hogy a tehénborsó szisztemikus fertőzésében a 2a fehérje 631. és 641. aminosavának van döntő jelentősége (Kim és Palukaitis, 1997; Karasawa és mtsai., 1999). Cukkini növényeknél a 2a fehérje 267. aminosavának döntő szerepe van a vírus terjedésére növényen belül, valamint a tünetek kialakulásának ütemére (Choi és mtsai., 2005). *Nicotiana glutinosa* növényeknél a 2a fehérje 777-758. aminosavak közé eső régiója alapvető fontosságú a vírus RNS akkumuláció szintjében és a tünetek erősségének meghatározásában az I. alcsoportba tartozó CMV-k esetén, ugyanakkor a II. alcsoportba tartozó CMV-kenél ennek a régiónak nincs patológiai jelentősége (Du és mtsai., 2008). A 2a fehérje közvetlen kapcsolatba léphet a 3a fehérjével is, azonban ennek a kapcsolatnak a vírus „életklusában” betöltött szerepe még nem tisztázott (Hwang és mtsai., 2005).

### 2. 2. 1. 3. A 2b fehérje

A cucumovírusok legkisebb fehérjéje, hossza mintegy 93–127 aminosav. Előfordulását a *Bromoviridae* családon belül a *Cucumovirus* és az *Ilarvirus* nemzetségeknél figyelték meg (Xin és mtsai., 1998). A 2b fehérjét, a 2a-hoz hasonlóan az RNS2-n lévő gén kódolja, azonban átíródása a szubgenomi RNS4A-ról történik. Az ORF részben átfed a 2a karboxi-terminális régiójával, azonban a fehérje leolvasása +1 nukleotid eltolódással történik.

A 2b fehérjét először CMV esetén Ding és mtsai. (1994) írták le, azonban az ismert fehérjecsaldoktól jelentősen eltérő aminosav sorrendje miatt a vírus életciklusában betöltött szerepe kérdéses volt. Az azóta eltelt években ismereteink jelentősen gyarapodtak a 2b fehérje funkcióival kapcsolatban és a 2b fehérje felfedezése alapvető fontosságú volt a géncsendesítés mechanizmusának megismerésében is.

A CMV 2b fehérjét *in vivo* elsősorban a sejtmagból mutatták ki, illetve bizonyították, hogy a fehérje 22–36. aminosavak közötti bázikus régiója sejtmagi lokalizációs jelként működik (Lucy és mtsai., 2000).

A 2b fehérje részletes vizsgálata bizonyította, hogy jelenlét gátolja a növény transzkripció utáni géncsendesítési (post-transcriptional gene silencing, PTGS) mechanizmusát (Brigneti és mtsai., 1998; Li és mtsai., 1999), megakadályozza, hogy a géncsendesítési szignálmolekulák aktiválják a géncsendesítést a szisztemikusan fertőzött szövetekben (Guo és Ding, 2002). A 2b fehérje közvetlen kötéssel gátolja a siRNS és az Argonaute molekulák aktivitását (Goto és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 2006). Mindemellett a 2b fehérje gátolja a szalicilsavon (Ji és Ding, 2001) és a jázminsavon (Lewsey és mtsai., 2010) alapuló növényi védekezési mechanizmust is. Valószínűleg mindkét esetben a védekezési mechanizmusban szerepet játszó gének expressziójának szabályozásán keresztül.

A 2b fehérje mindemellett fontos patológiai determinánsa is a cucumovírusoknak, így fontos szerepe van a vírus hosszú távú mozgásában (Diaz-Pendon és mtsai., 2007), különösen a növény osztódó szövetei esetén (Sunpapao és mtsai., 2009). A gazdanövénykör és a tünetek meghatározásában is nélkülözhetetlen (Ding és mtsai., 1994; 1995). A 2b fehérje képes közvetlenül megzavarni a növényi mikroRNS szabályozási folyamatokat, valamint a gazda fehérjék aktivitását direkt kölcsönhatás útján gátolhatja (Inaba és mtsai., 2011; Lewsey és mtsai., 2007; 2009). A nekrotikus tünetek kialakulását *Arabidopsis* növények esetén részletesen vizsgálták. A 2b fehérje C-terminális régiója kötődik az *Arabidopsis* kataláz3 (CAT3) enzimhez, ami így nem képes elbontani a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulákat, aminek felhalmozódása vezet a növényi sejtek pusztulásához (Inaba és mtsai., 2011). A 2b fehérje két foszforilációs helyének és nukleáris lokalizációs szignál helyének mutációja a 2b fehérje stabilitását csökkenti, aminek következménye a vírus virulenciájának csökkenése (Gonsáles és mtsai., 2010).

PSV esetében a 2b fehérjét nem termelő, illetve az N-terminális régióban részlegesen csonkított fehérjéjű vírusokkal *N. tabacum* protoplasztot és *N. benthamiana* növényeket fertőztek. Mindkét konstrukció esetében megállapították, hogy a 2b fehérje nem befolyásolja a vírus sejten belüli replikációját, viszont felelős



az inokulált és szisztémikus levelekben a vírus-akkumuláció kialakulásáért (Netsu és mtsai., 2008). Du és mtsai. (2008) szintén a 2b, illetve a 2a fehérje C-terminális régiójának szerepét bizonyította a vírus-akkumulációt és a tünetek jellegét illetően.

#### 2. 2. 1. 4. A 3a fehérje

Más néven a cucumovírusok mozgási fehérjéje (movement protein, MP). A 3a fehérjét az RNS3 amino-terminális részén elhelyezkedő gén kódolja, translációja is innen történik. Hossza megközelítőleg 280 aminosav, molekulatömege 30 kDa. A cucumovírusok MP aminosav szekvenciája a mozgási fehérjéket magába foglaló, a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) MP-je alapján elnevezett „30K” szuperfamiliaiba sorolható. Az ide tartozó fehérjék egy 33 aminosav hosszú konzervált részt tartalmaznak (Mushegian és Koonin, 1993), amely régió az ismert adatok alapján a CMV izolátumok esetén összesen 1 aminosavban térhet el, míg a PSV izolátumok esetében 8 aminosav is lehet az eltérés (Hu és mtsai., 1998).

A 3a fehérje legnagyobb mennyiségben a sejtfalban lokalizálódik (Vaquero és mtsai., 1994), de jelentős mennyiség található a citoplazmában is (Kaplan és mtsai., 1995). A CMV MP-jét zöld fluoreszcens fehérjével (green fluorescent protein, GFP) fuzionáltatva a MP elsősorban a plazmodezmák bejáratánál és a központi csatornáknál mutatható ki (Oparka és mtsai., 1996). A 3a fehérje mind RNS-, mind DNS kötő aktivitással rendelkezik (Li és Palukaitis, 1996). A 3a protein módosítja a plazmodezmák szerkezetét, azok átjárhatóságát növeli. Passzív transzporttal (diffúzió) normál körülmények között a maximum 2 nm átmérőjű, mintegy 800 Da molekulatömegű anyagok képesek átjutni a plazmodezmákon (összefoglalót: Crawford és Zambryski, 1999). A 3a fehérje mikroinjektálása után mintegy 10 kDa molekulatömegű fluorescein-izotiocianáttal jelölt dextrán molekulák is képesek a levél mezofillum sejtjei között mozogni (Vaquero és mtsai., 1994), valamint a vírus RNS transzportját is hasonló módon elősegíteni (Ding B és mtsai., 1995). A vírus RNS transzportja cucumovírus specifikus, a 3a fehérje más víruscsoportba tartozó vírusok sejtről-sejtre terjedését nem tudja segíteni, csak abban az esetben, ha a karboxi-terminális 33 aminosavat

eltávolítják (Nagano és mtsai., 1997). Tehát a MP nélkülözhetetlen a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez.

A vírus hosszú távú mozgásában is fontos szerepe van a MP-nek. Li és mtsai. (2001) CMV esetében a MP 60. aminosav pozíciójában a prolint alaninra cserélték, amely ugyan nem befolyásolta a vírus rövid távú mozgását, de a mutáns vírus hosszú távú mozgása a változás hatására hőmérsékletérzékenységet mutatott. Choi és mtsai. (2005) megállapították, hogy a CMV esetében mind a 2a fehérje, mind a MP jelentős szerepet játszik a vírus szisztemikus terjedésében cukkini (*Cucurbita pepo* convar. *gironmontia* cv. Black Beauty) növényben. Mindkét fehérje, egymástól függetlenül, de befolyásolja a vírus hosszú távú mozgását.

A 3a fehérjének bizonyos esetekben a vírus tüneteinek meghatározásában is fontos szerepe van. Bizonyították, hogy dohány növényeken a tünetek ciklikus megjelenéséért és eltűnéséért a 3a fehérje a felelős (Gal-on és mtsai., 1996). Amennyiben az Fny-CMV 51. és 240. aminosavát megváltoztatták, a ciklikus tünetek eltűntek és állandó, folyamatosan jelen lévő erős mozaik tünetek alakultak ki. Ugyanezek a mutációk tök növényeknél a vírus szisztemikus mozgásának hatékonyságának csökkenését okozzák (Kaplan és mtsai., 1997). Choi és mtsai. (2005) a 3a fehérje 168-as aminosavának szerepét bizonyították tök növényeken a szisztemikus tüneteinek megjelenésében. A két CMV alcsoport között jellemző tüneti eltérés, hogy dohány (*N. tabacum*) növények inokulált levelein a II. alcsoporthoz tartozó izolátumok nekrotikus gyűrűket indukálnak, míg az I. alcsoporthoz tartozó izolátumoknál ezt sohasem figyelték meg. A nekrotikus gyűrűk kialakulásáért az RNS3 5' régiója felelős, ami az 5' nem kódoló régiót és a 3a fehérje közel 2/3-át tartalmazza (Zhang és mtsai., 1994). Különböző TAV izolátumok esetében pedig azt bizonyították, hogy a tünetek súlyossága korrelál a 3a fehérje mennyiségével, miközben a vírus RNS illetve a CP mennyisége nem változik (Moreno és mtsai., 1997).

### 2. 2. 1. 5. A3b fehérje

A 3b fehérje a vírus köpenyfehérjéje (coat protein, CP). A 3b gén az RNS3 3' felén helyezkedik el és a MP-től egy nem-kódoló, megközelítőleg 260 nt hosszú IR (intercisztronikus régió) választja el. Terméke a 24 kDa molekulatömegű CP, amely a szubgenomi RNS4-ről transzlálódik (Habibi és Francki, 1974; Davies és Symons, 1988). Elsődleges feladata a víruspartikulum felépítése, a vírus RNS becsomagolása. A különböző cucumovírusok köpenyfehérjéi kevert köpenyfehérje burok létrehozására is képesek, valamint egymás RNS-eit is becsomagolhatják (heteroenkapszidáció) (Chen és Francki, 1990; Masashi és mtsai., 2003; Chen és mtsai., 1995). A CP N-terminális régiója argininben gazdag, erősen pozitív töltésű és nélkülözhetetlen a vírus részecske kialakulásához (Schmitz és Rao, 1998). A CP a virális RNS-t specifikusan köti (Mossop és Francki, 1978).

A CP nélkülözhetetlen a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez. Amennyiben a CP-t eltávolították, a vírus replikáció protoplaszt rendszerben továbbra is működött, azonban növényeken még lokális fertőzés sem tudott kialakulni (Suzuki és mtsai., 1991; Bocard és Baulcombe, 1993). Amennyiben a köpenyfehérjének csak az amino-terminális részét távolították el, a vírus lokális tünetek kialakítására képes maradt, de szisztemikus tünetek nem alakultak ki, vagyis a vírus hosszú távú mozgása gátolt volt (Suzuki és mtsai., 1991). A hosszú távú mozgásban a CP jelenléte azért is meghatározó, mivel a cucumovírusok vírusrészecske formájában jutnak el a fertőzés helyétől a növény szállítószövet rendszerén keresztül a növény távolabbi, nem fertőzött részeihez (Taliani és García-Arenal, 1995).

A cucumovírusok levéltetű átviteléért szintén a vírus köpenyfehérjéje a felelős (Chen és Francki, 1990). A levéltetű átvitelhez nélkülözhetetlen a 129. aminosav pozícióban levő prolin, míg a 162. aminosav pozícióban elhelyezkedő alanin az átvitel hatékonyságát befolyásolja (Perry és mtsai., 1994). A CP fehérjeszerkezet ismeretében elmondható, hogy a 129. aminosava a köpenyfehérje felszínén, egy hurok részen, míg a 162-es aminosav a kapszid belsejében, szintén egy hurokban található (Wikoff és mtsai., 1997). Perry és mtsai. (1998) a CP 25., 129., 162., 168. és 214. aminosavainak szerepét is bizonyították a levéltetű

átvitelben, míg Liu és mtsai. (2002) egy felszíni determináns ( $\beta$ H- $\beta$ I hurok) meghatározó szerepét azonosították.

A CP patológiai determinánsként is elsődleges fontosságú. A legtöbb esetben a köpenyfehérje 129. aminosavának szerepét bizonyították. Például ez az aminosav a klorotikus tünetek kialakulásában meghatározó fontosságú. A zöld mozaik tüneteket okozó izolátumok esetén (C-CMV, D-CMV, Fny-CMV, O-CMV) ebben a pozícióban mindig prolin található, míg a klorózist indukáló izolátumok esetén (FC-CMV, M-CMV, PG-CMV, Y-CMV) szerin vagy leucin helyezkedik el itt (Shintaku és mtsai., 1992). Szintén a 129. aminosav a felelős az érnekrózis, illetve a nekrotikus lokális léziók kialakításáért dohány növényeken (Suzuki és mtsai., 1995), valamint a C24 *Arabidopsis* növényeken kialakuló nekrotikus lokális léziók indukációjáért (Takahasi és mtsai., 2001). A 129-es aminosav szerepét dohány növényeken egy teljes mutáns sorozattal is vizsgálták, ahol a 129-es pozícióba 19 különböző aminosavat építettek be (Mochizuki és Ohki, 2011). A mutánsok közül a poláris aminosavak (E, D) halványzöld mozaik tüneteket indukáltak, a bázikus mutánsok (K, H) és a hidrofób aminosavakat (I, L, V) hordozó izolátumok nekrotikus tüneteket mutattak és néhány poláris, töltéssel nem rendelkező aminosavat (C, S, Q) tartalmazó mutáns vírus klorózist indukált. A 129. pozícióban elhelyezkedő aminosav tüneteket meghatározó szerepe nem gazdaspecifikus, mert nem csak a dohány növényeken kialakuló tünetek jellegét határozza meg, hanem ugyanilyen szerepe van új-zélandi spenót (*Tetragonia expansa*), a keserű dinnye (*Momordica charantia*) és a *Physalis floridana* növényeken is (Kobori és mtsai., 2003).

A CP egyéb aminosavainak a tünetek kialakításában betöltött szerepéről sokkal kevesebb adat ismert. A 111-es (I-T) és a 124 (I-V) aminosavak együtt határozzák meg az Y-CMV esetén a klorotikus tünetek/mozaik tünetek kialakítását dohány növényeknél (Sugiyama és mtsai., 2000), míg ugyanennél az izolátumnál a 36. aminosav mutációja (S-P) nekrotikus lokális léziókat indukál dohány növényeken (Takahashi és mtsai., 2000). Az Fny-CMV esetén a 192. aminosav megváltoztatása (D-K) hatására a mozaik tünetek helyett szisztemikus nekrosis alakul ki (Liu és mtsai., 2002).

### 2. 2. 2. A vírus-gazdanövény kapcsolatok

A cucumovírusok a növényeket rendszerint rovar vektorok (levéltetvek) segítségével fertőzi, valamint gyakori a mechanikai sérülések útján történő fertőződés is akár mezőgazdasági tevékenységek következtében. A növénybe jutó vírusok különböző kapcsolatokat alakíthatnak ki a növényekkel. Kompatibilis kapcsolat esetén a fertőző vírus először kicsomagolódik a köpenyfehérje burkából a fertőzött sejtekben, majd megtörténik a vírusfehérjék transzlációja és ezt követően a vírus örökítőanyagának megsokszorozódása, a replikáció is bekövetkezik. Miközben a „vírusszaporodás” a fertőzött sejtben megtörténik, rendszerint a növény védekezési mechanizmusának működése és a vírus részéről ennek gátlása is folyamatba lép. Az egyes sejtek fertőzése után a teljes növény megbetegítésének következő fontos lépése, hogy a vírus a megfertőzött sejt körüli szomszédos sejtekbe is átjusson. Ez az úgynevezett sejtről-sejtre terjedés vagy rövid távú mozgás folyamata, ami a plazmodezmatákon keresztül történik meg a vírusfehérjék aktív közreműködésével. Cucumovírusok esetében a 3a fehérje és a köpenyfehérje nélkülözhetetlen a sejtről-sejtre terjedéshez (Suzuki és mtsai., 1991; Bocard és Baulcombe, 1993). A teljes növény megbetegítéséhez a vírusnak el kell jutnia a növény távolabbi részeibe, nem fertőzött leveleibe, virágjához és később akár a termésébe is bekerülhet. Ez a vírus hosszú távú mozgása, ami a növény szállítószövet rendszerén keresztül történik, a cucumovírusok esetén összeépült víruspartikulum formájában (Kaplan és mtsai., 1998, Schmitz és Rao, 1998). A mutációs kísérleteket eredményeiket direkt megfigyelésekkel, elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is alátámasztották, valamint a víruspartikulum és a p48 növényi floém fehérje közötti közvetlen kapcsolatot is bizonyították (Requena és mtsai., 2006). Mind a MP esetében, mind a CP-nél azonosítottak izolátum specifikus hosszú távú mozgásban szerepet játszó részeket (Kaplan és mtsai., 1997; Ryabov és mtsai., 1999), valamint az 1a fehérje szerepét is felvetették (Palukaitis és García-Arenal, 2003). A szállítószöveten keresztüli vírustranszport lényegesen gyorsabb folyamat a lokális fertőzés kialakulásánál, végeredménye pedig a növény szisztemikus fertőzöttsége.

Inkompatibilis vírus-gazdanövény kapcsolat esetén a növény a vírusfertőzés különböző stádiumait állíthatja meg, aminek következtében nem alakul ki szisztemikus fertőzés. Esetenként már működőképes replikáz komplex sem jön létre (Hamamoto és mtsai., 1997), vagy a sejtről-sejtre terjedése, esetleg a hosszú távú mozgása gátolt a vírusnak az adott gazdanövényben (Ryu és mtsai., 1998; Mise és mtsai., 1993). A hiperszenzitív válaszreakció (HR) esetén a növény lokalizálja a fertőző vírust, gyakran lokális nekrotikus tünetek megjelenésével párhuzamosan. Ilyen esetekben a vírus replikálódik a megfertőzött sejtben, majd a szomszédos sejtekbe is átjut, azonban a nekrozissal párhuzamosan a távolabbi sejteket már nem tudja megfertőzni meg. Ezekben az esetekben feltételezik, hogy a növény valamelyik vírusfehérjét felismeri, mint elicítort (avirulencia faktornak is nevezik), és így közvetlenül vagy közvetve aktiválódik a védekezési reakció. Az avirulencia faktor lehet akár az RNS függő RNS polimeráz (Abbink és mtsai., 2001; Erickson és mtsai., 1999), a köpenyfehérje (Bendahmane és mtsai., 1995, Gilardi és mtsai., 2004) vagy akár a mozgási fehérje (Weber és mtsai., 1993; Scolthof és mtsai., 1995), sőt egy esetben a vírus RNS-ről is bizonyították, hogy HR elicítorként viselkedhet (Szittyá és Burgyán, 2001).

### **2. 2. 3. A cucumovírusok csoportosítása**

#### **2. 2. 3. 1. Az uborka mozaik vírus izolátumok csoportosítása**

Patológiai, szerológiai, valamint nukleinsav sorrend hasonlóság alapján az uborka mozaik vírus törzsek két fő alcsoportba sorolhatók (Devergne és Cardin, 1973; Szilassy és mtsai., 1999a). A jelenleg használt, nukleinsav homológiát tükröző felosztás I. és II. alcsoportjai gyakorlatilag megfelelnek a DTL és ToRS szerotípusoknak (Wahyuni és mtsai., 1992) illetve a C és B patotípusoknak. A két alcsoport földrajzi elterjedése jellegzetesen eltérő: az I. alcsoport tagjainak hőmérséklet-optimuma magasabb, mint a II. alcsoport tagjainak (Daniels és Campbell, 1992). A természetben előforduló CMV izolátumok többsége (kb. 80%) az I. alcsoportba sorolható, míg a II. alcsoportba tartozó izolátumok jóval ritkábbak (Crescenzi és mtsai., 1993; Fraile és mtsai., 1997). Roosinck és

munkatársai (1999b) az I. alcsoport további bontását javasolták IA és IB csoportokra a vírus RNS3 molekulájának 5' nem-kódoló régiója alapján.

A különböző CMV izolátumok szinte minden növényt képesek fertőzni, ugyanakkor a különböző izolátumok által indukált tünetek, illetve az általuk fertőzött növények között jelentős eltérések vannak. Napjainkban a GenBank adatbázisában több mint 8000 CMV-hez kapcsolódó szekvencia található, ami tartalmazza a teljes nukleinsav sorrendek mellett a részleges genomszekvenciákat és a CMV-hez kapcsolódó szatellit RNS-ek nukleinsav sorrendjét is.

## **2. 2. 3. 2. A földimogyoró satnyulás vírus izolátumok csoportosítása és evolúciója**

A PSV izolátumokat sokáig két nagy csoportra bontották szerológiai és nukleinsav homológia viszonyaik alapján (Hu és mtsai., 1997, 1998; Naidu és mtsai., 1995). Mindkét alcsoportot Észak-Amerikában írták le, de földrajzilag jól elkülönülve. A PSV I. (E-eastern) alcsoportja és az ide tartozó izolátumok Észak-Amerika délkeleti régióiban fordultak elő (Mink és mtsai., 1967, 1969; Mink, 1972). Alapvető elkülönítése az akkor ismert II. alcsoporttól két tesztnövény segítségével történt. Az I. alcsoport izolátumai 'Tennessee' fajtájú zöldbab (*Phaseolus vulgaris*) inokulált levelein nekrotikus léziókat, csúcsi levelein nekrotikus gyűrűket és érnekrózist idéztek elő. A II. alcsoport izolátumai ugyanezen növényen nekrosis nélküli mozaik tüneteket indukáltak (Adams és Antoniw, 2006). Az E-PSV mesterséges fertőzés során *C. amaranticolor* tesztnövényen lokális klorotikus léziókat okozott, szisztemizálódás nélkül. Földimogyorón lokális klorotikus léziót követően, mozaikot és satnyulást idézett elő, illetve lokálisan sem fertőzte a fehér akácot.

A II. (W-western) alcsoportot először Mink és mtsai. (1967, 1969) írták le. Az alcsoport típus izolátumát a W-PSV-t Washington államban babról gyűjtötték és az előzőekben említett tesztnövények segítségével tünettanilag egyértelműen elkülönítették a PSV I. alcsoportba tartozó izolátumoktól. A radioaktív hibridizációs és a nukleotid sorrend azonossági vizsgálatok egyértelműen a W-PSV eltérő alcsoportba tartozását erősítették meg (Hu és mtsai., 1997). A

gazdanövénykör vizsgálatok során megállapították, hogy a földimogyoró, uborka, paradicsom, lencse, zöldborsó, bab és rézvirág esetében a W-PSV mozaikos tüneteket okozott a szisztemikusan fertőzött leveleken, míg *C. amaranticolor*, *C. quinoa* esetében csak az inokulált leveleken alakultak ki tünetek lokális léziók formájában.

A PSV legkésőbb azonosított alcsoportja, a III. alcsoport Kínában a földimogyoró táblákon már a 70-es években jelentős károkat okozott. Az ide tartozó típus-izolátumokat földimogyoróról gyűjtötték 1985-ben és az általa okozott enyhe tünetek miatt Mi-PSV (mild) izolátumnak, az alcsoportot pedig III. (Kínai) alcsoportnak nevezték el (Xu és mtsai., 1998). A Mi-PSV teljes nukleotid sorrendje 2005-ben került meghatározásra. A többi adatbanki szekvenciával összehasonlítva a Mi-PSV 73,6–79,6 % nt azonosságot mutatott, mely érték alapján külön alcsoportba soroltá (Yan és mtsai., 2005). A Mi-PSV nem fertőzi a rézvirágot és a borsót, nekrotikus lokális léziókat idéz elő a fehér akác inokulált levelein, azonban szisztemizálódás nem figyelhető meg. A Mi-PSV és a további 5 izolátum *C. quinoa* és *C. amaranticolor* esetében is lokális léziók kialakulását követően a növényben szisztemizálódott és a csúcsi leveleken mozaik tüneteket okozott (Xu és mtsai., 1998).

### 2. 2. 3. 3. A paradicsom magtalanság vírus izolátumok

A víruscsoportba tartozó vírusok közül a TAV izolátumoknál ismert a legkevesebb nukleinsav sorrend, ugyanakkor ezek alkotják a leghomogénebb csoportot. Az ismert izolátumok nukleinsav szinten 96-98 %-os homológiát mutatnak, míg fehérjék szintjén 99 % homológia a jellemző. Patológiai jellemzőik között is minimális az eltérés. Némelyik izolátum az uborkát nem fertőzi bár uborka protoplasztokban replikálódik (Salánki és mtsai., 1997), míg más izolátumok az inokulált szikleveleken lokális léziókat indukálnak, de a vírus hosszú távú mozgása ezekben az esetekben is gátolt.



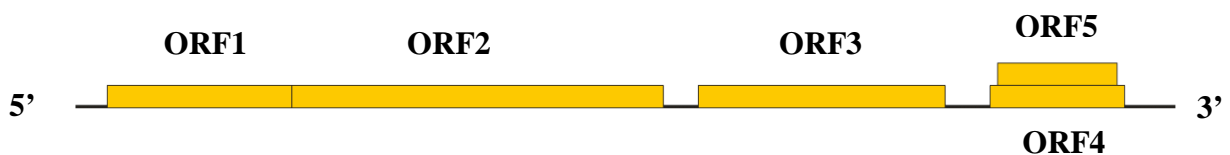
### 2. 3. A *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus

A *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) a *Tombusvirusviridae* család, a *Tombusvirus* nemzetség névadó faja. Nevét a természetes gazdanövényeinek számító orchideákról kapta, amelyeken jellegzetes gyűrűsfoltosságot idéz elő.

Gazdanövényköre a cucumovírusokénál sokkal kisebb, mintegy 23 növény családba tartozó körülbelül 60 fajt képes megfertőzni, legtöbbet közülük is csak lokálisan. Természetes körülmények között terjedése fertőzött talajon keresztül történik, vektorátvitelt CymRSV esetében nem írtak le (Hollings és mtsai., 1977). Üvegházi körülmények között fenntartása mechanikai átvittel történik.

A többi tombusvírushoz hasonlóan a CymRSV genomja is egy 30 nm átmérőjű ikozahedrális részecskébe csomagolódik, amely 180 darab egyforma köpenyfehérje alegységből épül fel. A CymRSV genom osztatlan, egy darab, egyszálú, pozitív értelmű RNS alkotja. A CMV-től eltérően a vírus RNS 5' végén nem található 7-metilguanozin sapka, a 3' vége pedig nem képes tRNS-szerű másodlagos szerkezetet kialakítani (Russo és mtsai., 1994).

A 4,7 kb hosszúságú CymRSV genomi RNS-en öt nyílt leolvasási keret található, melyek a vírus öt fehérjéjét kódolják (5. ábra).



5. ábra A CymRSV genomszerveződése

A genomi RNS 5' terminális régiójában kódolódó fehérjék transzlációja közvetlenül a genomi RNS-ről történik (ORF1 és ORF2), míg a többi ORF transzlációja szubgenomi RNS-eken keresztül megy végbe (ORF3, ORF4, ORF5). A nagyobbik szubgenomi RNS 2,1 kb hosszúságú és három ORF található rajta, azonban innen is csak az 5' terminális ORF3 transzlálódik. A kisebb szubgenomi

RNS 0,9 kb hosszúságú és két átfedő ORF-et tartalmaz (ORF4 és ORF5). Mindkettő fehérje erről az RNS-ről íródik át (Russo és mtsai., 1994).

Az ORF1 stop kodonnal végződik, amelyet a riboszómák mintegy 0,05 gyakorisággal átolvasnak és folytatják a fehérjeszintézist az ORF2 végén található stop kodonig. Így az ORF1 által kódolt 33kDa-os fehérje is transzlálódik. Számos kísérleti eredmény bizonyítja, hogy a két fehérje együttes jelenléte szükséges a vírus replikációjához (Scholthof és mtsai., 1995). A 92 kDa-os fehérjének RNS függő RNS polimeráz aktivitást tulajdonítanak (Hearne és mtsai., 1990), míg a 33 kDa-os fehérje a replikációs complex membránhoz rögzítésében játszik szerepet (Rubino és Russo, 1998).

Az sgRNS1-ről íródik át a 41 kDa méretű köpenyfehérje (ORF3) (Russo és mtsai., 1994). Köpenyfehérje mutáns tombusvírusok vizsgálatával igazolták, hogy jelenléte a vírus replikációjához is szükséges (Dalmay és mtsai., 1992; Scholthof és mtsai., 1993). A CMV-vel ellentétben a CymRSV köpenyfehérje eltávolítása nem befolyásolja a CymRSV rövid távú mozgását, tehát a vírusnak nincs szüksége ép köpenyfehérje jelenlétére a sejtről-sejtre terjedéshez. Ráadásul a CP deficiens CymRSV mutáns hosszú távú mozgásra is képes, azonban ennek hatékonysága egyrészt jelentős mértékben csökken a vad típusú víruséhoz képest, másrészt függ a vizsgált gazdanövénytől (Dalmay és mtsai., 1993).

A másik szubgenomi RNS (sgRNS2) két, egymással átfedő ORF-et tartalmaz, melyek egy-egy fehérjét kódolnak. Az ORF4 által kódolt 22 kDa-os fehérje a vírus mozgási fehérjéje (MP), de jelentős szerepet játszik a vírus gazdaspecifitásban, egy-egy adott gazdanövény-vírus kölcsönhatás kialakításában (Dalmay és mtsai., 1993; Scholthof és mtsai., 1995; Chu és mtsai., 1999). A CymRSV MP is az előző fejezetekben már említett 30K MP szupercsaládba tartozik és a vírus TMV-típusú rövid távú mozgását segíti elő.

Az ORF4 start kodonján a riboszómák gyakran "átcsúsznak", és így az ORF5-ről is keletkezik fehérje (Scholthof és mtsai., 1999). Az ORF5 által kódolt 19 kDa nagyságú fehérje (p19) elsődleges funkciója a növény vírusok elleni védekező mechanizmusának hatástalanítása. A 19 kDa-os fehérje megakadályozza a szisztémikus PTGS szignál terjedését, és így gátolja a vírus indukálta PTGS-t

(Silhavy és mtsai., 2002). Havelda és mtsai. (2003) a CymRSV p19 defektív mutáns változatát vizsgálva megállapították, hogy a 19 kDa fehérje hiányában a szisztemikus PTGS szignál molekulák gyorsabban mozognak a növényben, mint a vírus, PTGS-t indukálnak a szisztemikus szövetekben, így az ott megjelenő vírus RNS azonnal lebomlik. Ennek a fehérjének szerepe van még a vírus által okozott tünetek kialakulásában is (Dalmay és mtsai., 1993; Scholthof és mtsai., 1995; Burgyán és mtsai., 2000).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3. 1. Vegyszerek, enzimek, kettek

A vegyszereket különböző kereskedelmi forrásból szereztük be (Merck, Sigma, Serva, BioRad, Reanal). A restriktív endonukleázokat, polimerázokat és modifikáló enzimek nagy részét a Fermentas-tól, kisebb részüket a New England Biolabs, Promega és Roche cégektől rendeltük. A radioaktívan jelzett nukleotidokat az IZINTA-tól vásároltuk, a próba készítéshez a Fermentas Hexalabel DNA Labeling kettjét használtuk. A konjugált ellenanyagokat a Loewe Biochemica GmbH-től szereztük be. PCR termékek klónozásához a pGEM-T-Easy kett (Promega) használtuk.

#### 3. 2. Növények

A kísérletekhez a növényeket üvegházi körülmények között neveltük, illetve fitotronban tartottuk, 14 óra megvilágítás (23 °C) és 10 óra sötétség (18 °C) környezeti paraméterek mellett.

Munkánk során a következő teszt növényeket használtuk: *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc, *Nicotiana clevelandii* Gray., *Nicotiana benthamiana* Domin., *Nicotiana debney* Gray., *Cucumis sativus* L. cv. Marketer vagy Delicates, *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Zinnia elegans* Jacq., *Arachis hypogea* L., *Lens culinaris* Medik. cv. Éva, *Medicago sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. cv. Babilon, *Pisum sativum* L. cv. Rajnai törpe, *Robinia pseudoacacia* L., *Vigna sinensis* Savi et Hassk. cv. Black eye, *Solanum lycopersicum* L. cv. Kecskeméti jubileum.

#### 3. 3. Baktériumtörzsek

Kísérleteink során az *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , JM101, JM109 és TG90 törzseit használtuk.

### 3. 4. Vírus izolátumok

Munkánk során az I. alcsoportba tartozó CMV-Rs törzset dr. Salamon Pál izolálta retekéről (*Raphanus sativus* L.) és bocsátotta rendelkezésünkre. Az uborka mozaik vírus nekrotikus törzsét (CMV-N) Fulton izolálta 1953-ban (Fulton, 1953). Gazdanövénykörének részletes jellemzését, szerológiai besorolását, illetve köpenyfehérje génjének nukleotid sorrendjének meghatározását Salamon és munkatársai végezték el 1998-ban (Salamon és mtsai., 1998). Vizsgálatainkhoz a nekrotikus törzs *Nicotiana glutinosa*-n ötszöri passzálása után nyert CMV-Ns változatát használtuk.

A II. alcsoportba tartozó CMV izolátumok közül a fehérheréről (*Trifolium repens* L.) izolált CMV törzset: Trk7-CMV (Beczner és mtsai., 1978) és egy Franciaországból származó CMV izolátumot, R-CMV (Jacquemond és Lot, 1981) használtunk.

TAV esetében egy paprikáról származó izolátummal P-TAV dolgoztunk (Salamon és mtsai., 1976).

A PSV-Rp törzset 2002-ben dr. Salamon Pál izolálta Gödöllőn fehér akácról és bocsátotta rendelkezésünkre. A munkánk során vizsgált további kilenc PSV izolátumot (1. táblázat) a Pannon ökorégió területén, enyhe mozaik és levél deformáció tüneteket mutató fehér akác növényekről gyűjtöttük 2007 és 2008 években. Az izolátumokat *C. quinoa* növényen történt háromszori egyléziós passzálást követően *N. benthamiana*. tesztnövényeken szaporítottuk fel a további vizsgálatok elvégzéséhez.

**1. táblázat** A vizsgált PSV izolátumok gyűjtési adatai

| Izolátum neve | Gyűjtési hely              | Gyűjtési év | Gyűjtötte           |
|---------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| PSV-B         | Budapest, Magyarország     | 2008        | Dr. Kiss László     |
| PSV-Cs        | Mezőcsát, Magyarország     | 2008        | Dr. Kondrák Mihály  |
| PSV-F         | Füzesgyarmat, Magyarország | 2008        | Dr. Kiss László     |
| PSV-Ljb       | Ljubljana, Szlovénia       | 2008        | Dr. Kiss László     |
| PSV-Rp        | Gödöllő, Magyarország      | 2002        | Dr. Salamon Pál     |
| PSV-Rp2       | Gödöllő, Magyarország      | 2007        | Dr. Kiss László     |
| PSV-Sz        | Szeghalom, Magyarország    | 2008        | Dr. Kiss László     |
| PSV-T1        | Tihany, Magyarország       | 2008        | Dr. Salánki Katalin |
| PSV-T2        | Tihany, Magyarország       | 2008        | Dr. Salánki Katalin |
| PSV-Tev       | Tevel, Magyarország        | 2008        | Antal Ferenc        |

Az általunk használt CymRSV izolátumot dr. Burgyán József bocsátotta rendelkezésünkre (Hollings és mtsai., 1977).

**3. 5. Növények inokulálása**

Minden esetben 3–8 növényt inokuláltunk 2–8 leveles állapotban. A levelek felületét cellittel sértettük meg, majd tisztított vírussal vagy a fertőzött növény homogenizált levelével 20 mM-os K-Na foszfát pufferben (pH: 8,0) inokuláltuk a növényeket.

**3. 6. Oligonukleotid primerek**

Munkánk során a következő oligonukleotid primereket használtuk (2. táblázat).

## dc\_341\_11

### 2. táblázat A felhasznált oligonukleotid primerek

#### primerek klónozáshoz:

|                          |  |               |
|--------------------------|--|---------------|
| CMV I. alcso. 3' oligo   | <u>g</u> cggatcctggtctccttt                                | <i>Bam</i> HI |
| CMV I. alcso. RNS 1,2 5' | ggggg <u>cc</u> taatacgaactcactatagtttattacaagagcg         | <i>Apa</i> I  |
| CMV I. alcso. RNS3 5'    | ggctg <u>ca</u> gtaatacgaactcactatagtaactctaccac           | <i>Pst</i> I  |
| oligo dT                 | cggggatcctcgagaagctttttttttttttt                           | <i>Bam</i> HI |
| PSV123-PstI              | ggctg <u>ca</u> gtggtctcctatggagccctcatag                  | <i>Pst</i> I  |
| PSV12-T7-BamHI           | ggggatc <u>ct</u> aatacgaactcactatagttttatcaagagcgtacggttc | <i>Bam</i> HI |
| PSV3-T7BamHI             | ggggatc <u>ct</u> aatacgaactcactatagtttaaaccaacaaaacctgag  | <i>Bam</i> HI |
| PSV862for                | caaaaagcgattggtagttag                                      |               |
| CMV833Bam                | gggatccgagtcgagattttaaacgaa                                | <i>Bam</i> HI |
| CMV-STOP-IR/Bsa          | atac <u>ac</u> gtatatataacaacaggcctaagaccgtaaccacctg       | <i>Bsa</i> AI |
| CymRSV-Spe               | cgactagtcatggacactgaataccaac                               | <i>Spe</i> I  |
| CymRSV-Age               | gcaccggcttagactgaagagtctgtcc                               | <i>Age</i> I  |
| CMVIIalcso.3' oligo      | ggctgca <u>g</u> tggtctccttatggagaacctgtgg                 | <i>Pst</i> I  |
| CMVIIalcso RNA3 1247     | cgctcgtcgcccgcttagagg                                      |               |
| CMVIalcso RNA1 1324      | ggcgaacggatagacatcaatg                                     |               |
| TAV 3'                   | ggggg <u>cc</u> ctgggaccctaggg                             | <i>Apa</i> I  |

#### primerpárok mutáns vírusok előállításához:

| név         | 5' primer                                      | 3' primer  | endonukleáz felismerőhely |
|-------------|--|--|---------------------------|
| pTrk-Asn    | <u>gaattc</u> gtttagttgtttacc                  | <u>ggaattc</u> gttgatgctcgacgtcgacatgaagtacaatctcgtccttctctag        | <i>Eco</i> RI             |
| pTrk-Ser    | <u>gaattc</u> gtttagttgtttacc                  | <u>ggaattc</u> gttgatgctcgacgtcgacatgaagtacaatctcgtccttctctagtGAatcg | <i>Eco</i> RI             |
| βB-βC loop  | gga <u>GGcc</u> TActAGaaCtgagaaagAttcatatcttgg | ggAggCCtcagggtaatagatgtgaaagtg                                       | <i>Stu</i> I              |
| βD-βE loop  | ggtacgtattaatcctAGCccgaaattAattc               | ggtac <u>g</u> tatttgaatgcgcgaaac                                    | <i>Sna</i> BI             |
| βE-αEF loop | ggAc <u>TAGT</u> gccgccatcactgctatg            | gcACTAg <u>Ta</u> agaAGggTgTtTCaTCtactttccgaactgtaacc                | <i>Spe</i> I              |
| βF-βG loop  | cggG <u>ATC</u> cagCccaacaataagttactc          | cgGga <u>TC</u> ccggTcgGAcatactgataaac                               | <i>Bam</i> HI             |
| βH-βI loop  | aactCgag <u>GC</u> ggacgagatGgtac              | ttctCgag <u>TAC</u> atcgtcttctcagtaaaccagg                           | <i>Xho</i> I              |
| pR3K76R     | tga <u>GGcc</u> Tcctgaaattgagaaaggttc          | gga <u>GGcc</u> Tcagggtaatagatgtgaaagtg                              | <i>Stu</i> I              |

## dc\_341\_11

|                |  |   |                |
|----------------|--|---|----------------|
| pR3P78T        | cc <u>actag</u> tattaccctgaaaccgActgaaattgag         | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pR3E79R        | cc <u>actag</u> tattaccctgaaaccgcctAGAattgag         | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pR3EI79-80RT   | cc <u>actag</u> tattaccctgaaaccgcctAGaaCtgag         | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pR3G83D        | gg <u>actag</u> tattaccctgaaaccgcctgaaattgagaagAttca | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pR3PEI78-80TRT | cc <u>actag</u> tattaccctgaaaccgActAGaaCtgag         | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pR3E79A        | cc <u>actag</u> tattaccctgaaaccgcctgCaattgag         | gg <u>actag</u> tgaaagtgtaaccgggtttacag                   | <i>SpeI</i>    |
| pT3TRT78-80PEI | caaa <u>agct</u> tcggtcaaaggtaattatccc               | cc <u>gaagct</u> tttgccttctcaAttTCagGcggtcgaacatccaacgaag | <i>HindIII</i> |
| pT3BamHI       | ctc <u>gatc</u> ctatcgcacgttgagccac                  | gg <u>gatc</u> cgagtcgagattttaacgaa                       | <i>BamHI</i>   |
| pT3SpeI        | tac <u>actag</u> tttgatgttcgaccg                     | caa <u>actag</u> tgtagtataacctgcacg                       | <i>SpeI</i>    |
| pR3SpeI        | tt <u>actag</u> tattaccctgaaaccgc                    | a <u>actag</u> tgtgaaagtgtaaccggg                         | <i>SpeI</i>    |
| pT3NSR62K65R   | ggggATCCAAGagctgtaGaccgggttacac                      | ggGGATcccacgaaggttggtgg                                   | <i>BamHI</i>   |
| pR3SPT62K65R   | ggggATCCAAGagctgtaGaccgggttacac                      | ggGGATcccacgaaggttggtgg                                   | <i>BamHI</i>   |
| pR/L456F       | tccggccgctgctg                                       | ttcggccgagtAAAcg  | <i>XmaIII</i>  |
| pR/R461C       | tccggccgctgTGTgtg                                    | ttcggccgagtcaacg  | <i>XmaIII</i>  |
| pR/V462Q       | tccggccgctgctgCAGttttc                               | ttcggccgagtcaacg  | <i>XmaIII</i>  |
| pR/V467A       | gtctGCAgttcacgcactattccc                             | ggcTGCagaggagaaaaacacac                                   | <i>PstI</i>    |
| pR/H469R       | cCGAgctctattcccactttg                                | gggagcTCGaacaactggag                                      | <i>SacI</i>    |
| pR/C461R       | ggcttaAGGcagttttctctag                               | agCTtaagggacgagtaaagc                                     | <i>AflII</i>   |
| pNΔ461         | tccggccgctg.cagttttc                                 | ttcggccgagttaatgctgc                                      | <i>XmaIII</i>  |
| pT/R461C       | tccggccgcttTGTgtttc                                  | ttcggccgagacatagacgc                                      | <i>XmaIII</i>  |
| pN/C461R       | actaggcctctgCGCagttttctctagtgtgttcg                  | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461P       | actaggcctctgCCcagttttctctagtgtgttcg                  | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461A       | actaggcctctgGCcagttttctctagtgtgttcg                  | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461N       | actaggcctctgAAcagttttctctagtgtgttcg                  | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461S       | actaggcctctgTcTcagttttctctagtgtgttcg                 | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461E       | actaggcctctgGAGcagttttctctagtgtgttcg                 | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |
| pN/C461K       | actaggcctctgAAGcagttttctctagtgtgttcg                 | cagaaggcctagtaaatgctgcaaaccacttg                          | <i>SpeI</i>    |

(Mindegyik oligonukleotidban nagybetűvel jelöltük a megváltoztatott nukleotidokat, a restriktions endonukleáz hasítóhelyeket pedig aláhúztuk, a primereket 5'-3' irányban tüntettük fel.)



### 3. 7. Vírustisztítás és nukleinsav kivonás levélszövetből

A vírusizolátumokat különböző *Nicotiana* fajokon szaporítottuk fel. A vírusokat a jellegzetes tüneteket mutató növényekből 7-14 nappal a fertőzés után Lot és mtsai. (1972) által leírt módon tisztítottuk. A vírus RNS izolálást Peden és Symons (1973) szerint végeztük.

A növényekből illetve a protoplasztokból az össznukleinsav kivonást White és Kaper (1989) leírása alapján végeztük. Röviden: 1 cm átmérőjű levélkorongokhoz, illetve a centrifugálással összegyűjtött és lefagyasztott protoplasztokhoz 400 µl nukleinsav kivonó puffert adtunk, majd fenolkloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk és steril vízben oldottuk.

### 3. 8. A vírus RNS polyadenilálása

Öt µg tisztított vírus RNS-t poly(A) polimerázzal poliadeniláltunk a gyártó (BRL) utasításai szerint, így a továbbiakban oligo dT primer felhasználásával cDNS/PCR reakciót követően meghatározhattuk a vírus valós 3' vég szekvenciáját.

### 3. 9. Fertőzőképes vírusklónok

A II. alcsoportba tartozó Trk7-CMV törzs fertőzőképes klónjait leírtuk korábban (pTrk1, pTrk2, pTrk3, pR1, pR2, pR3) (Salánki és mtsai., 1997; Szilassy és mtsai., 1999b).

Az Rs-CMV, az Ns-CMV és az Rp-PSV fertőzőképes klónjainak előállításához a cDNS első szál szintézist a vírus RNS-einek 3' végén található, erősen konzervált motívummal komplementer oligonukleotid primerrel indítottuk. A szintézist M-MuLV reverz transzkriptázzal végeztük (Fermentas), a következő hőmérséklet grádiens szerint: 15 °C / 10 perc, 25 °C / 10 perc, 37 °C / 30 perc, 42 °C / 30 perc, 55 °C / 10 perc, 70 °C / 10 perc. A fokozatosan emelkedő hőmérséklet lehetővé tette a reverz transzkriptáz végighaladását a vírus RNS-en az erős másodlagos szerkezetek megbontása révén. A keletkezett heteroduplex molekulát polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk specifikus 5' végi és a

cDNS szintézis során használt 3' primerekkel. Az 5' primer minden esetben tartalmazta a T7 bakteriofág RNS polimeráz promóter konszenzus szekvenciáját. Kétfázisú PCR-t végeztünk: Az első 5 ciklus (40 mp denaturálás 94 °C, 40 mp anellálás 45 °C, 4 perc szintézis 72 °C) után az anellálási hőmérsékletet megemeltük 58 °C-ra a hátralevő 30 ciklusra. A keletkezett PCR termékeket agaróz gélben méret szerint szétválasztottuk, az egyes RNS-eknek megfelelő molekulákat a gélből izoláltuk. A PCR terméket restriktív enzimmel történt hasítás után a pBluescriptII KS+ (Stratagene) fágemid vektorba ligáltuk, vagy hasítás nélkül a pGEM-T-Easy vektorba építettük. Az Ns-CMV teljes hosszúságú genomi cDNS-eit hordozó klónokat pN1, pN2 és pN3-nak, az Rs-CMV hasonló klónjait pRs1, pRs2 és pRs3-nak, az Rp-PSV klónjait pRp1, pRp2 illetve pRp3-nak neveztük el.

### **3. 10. A vírus RNS-ek molekuláris klónozása, plazmidkonstrukciók elkészítése**

A különböző rekombináns klónokat a fertőzőképes klónok felhasználásával, standard módszerekkel (Sambrook és mtsai., 1989) készítettük a klónokban eredetileg meglévő közös, illetve csendes mutációval beépített restriktív hasítóhelyek felhasználásával.

#### **3. 10. 1. Trk7-CMV és R-CMV RNS3 rekombináns és mutáns klónok készítése a törpüléssel tünetek meghatározásához**

A rekombinánsok elkészítéséhez mindkét izolátum RNS3-án meglévő *ApaI*, *HindIII*, *AgeI*, *EcoRV* és a fertőzőképes klónok 3' vége után elhelyezkedő *PstI* restriktív endonukleáz hasítóhelyeket használtuk. A pRTrk-Apa és a pTrkR-Apa klónok esetén az *ApaI-PstI* szakaszt cseréltük ki a két fertőzőképes klón között. A pRTrkR-HindIII klónnál az R klón két *HindIII* hasítóhely közötti részét helyettesítettük Trk7-CMV eredetű résszel. A pRTrk-Age klónban az *AgeI-PstI* darab származott a Trk7-CMV-ből, a többi R-CMV eredetű volt. A pRTrkR-Age klón *ApaI* és *AgeI* restriktív hasítóhely közötti része volt Trk7-CMVszármazék, a klón többi része R-CMV eredetű volt. A pRTrkR-Eco klón két *EcoRV* hasítóhely közötti része származott a Trk-CMV-ből, míg a pTrkRTrk-Eco klón esetén az

*EcoRV* hasítóhelyek közötti rész R-CMV eredetű volt. A két pontmutánst (pTrk-Asn, pTrk-Ser) PCR irányította helyspecifikus mutagenezissel készítettük.

### 3. 10. 2. Rekombináns és mutáns R-CMV RNS3 klónok készítése a hosszú távú mozgásban kulcsfontosságú régió meghatározásához

Mind a köpenyfehérje felszíni hurkainak cseréjét ( $\beta$ B- $\beta$ C loop mutáns,  $\beta$ D- $\beta$ E loop mutáns,  $\beta$ E- $\alpha$ EF mutáns,  $\beta$ F- $\beta$ G mutáns,  $\beta$ H- $\beta$ I mutáns), mind a pontmutációkat a  $\beta$ B- $\beta$ C hurok régióban (pR3K76R, pR3P78T, pR3E79R, pR3E79A, pR3G83D, pR3EI79-80RT, pR3PEI78-80TRT) PCR irányította helyspecifikus mutagenezissel készítettük (Higuchi és mtsai., 1988).

### 3. 10. 3. Rekombináns CMV-TAV RNS3 klónok készítése MP-CP kompatibilitási vizsgálatokhoz

A pT3 és a pR3 klónokban azonos pozícióban nem találhatóak restrikciós hasítóhelyek, ezért a rekombinánsok elkészítéséhez csendes mutációval építettünk be mindkét klón azonos pozíciójába hasítóhelyeket. A pT3 klónba a CP start kodonját közvetlenül megelőzve korábban egy *NdeI* restrikciós enzim hasítóhelyet (Salánki és mtsai., 1997) illesztettünk. Most a 825-830 nt közötti részébe *BamHI* restrikciós enzim hasítóhelyet, míg a CP-be az 1338-1443 nt közötti részre *SpeI* hasítóhelyet építettünk PCR vezérelte mutagenezissel. Az *NdeI* hasítóhelyet felhasználva készült el a pTR illetve pRT konstrukció, melyekben a köpenyfehérje start kodonjától cseréltük ki a klónokat. Tehát ezek a klónok az egyik vírus 5' nem kódoló része és MP-je és intergénikus része mellett a másik vírus köpenyfehérjéjét és 3' nem kódoló régióját tartalmazza.

A következő két klón rekombináns MP-t hordoz, aminek amino-terminális része a *BamHI* hasítóhelyig a TAV-ból, míg karboxi-terminális része a CMV-ből származik. A pT3BSCMP klón a rekombináns MP mellett a TAV CP-t tartalmazza, míg a pTR3BSCMP a CMV CP-t hordozza.

A következő két mutáns a TAV MP mellett rekombináns CP-T tartalmaz. A pT3SPR konstrukció CP amino-terminális része, az *SpeI* hasító helyig TAV eredetű

és a karboxi-terminális rész származik a CMV-ből. A pT3NSR konstrukció CP-je az előző fordítottja, tehát az *SpeI* helyig CMV, míg utána TAV eredetű.

Az utóbbi két rekombináns CP-t hordozó vírust CMV MP-vel is elkészítettük (pR3NST, pR3SPT).

A pontmutánsokat a megfelelő rekombinánsokból PCR alapú mutagenézissel készítettük (pT3NSR62K65R, pR3SPT62K65R).

### 3. 10. 4. Rekombináns CMV-CymRSV RNS3 klónok készítése a heterológ MP szerepének meghatározásához

A CymRSV mozgási fehérje gén amlifikálásához a pCym19STOP klónt (Dr. Burgyán József szívességéből) használtuk. A pCym19STOP a CymRSV teljes hosszúságú cDNS klónjának egy olyan mutáns változata, melyben a CymRSV 5-ös leolvasási keretének harmadik és hatodik nukleotid pozíciójában két stop kodon található (Szittyá és Burgyán, 2001), aminek köszönhetően a MP-vel átfedő p19 fehérje kifejeződése megszűnik. Ebből a klónból olyan PCR primerek segítségével emeltük ki a MP-t, melyek *SpeI* illetve *AgeI* restrikciós hasítóhelyet tartalmaztak. A PCR terméket *SpeI*-*AgeI* restrikciós hasítás után a pR3 klónba, a MP-t megelőző *XbaI* és a MP végén elhelyezkedő *HpaI* hely közé ligáltuk, így lecserélve a CMV MP-jét a CymRSV mozgási fehérjéjére. A további munkákhoz az így készült pCMVcymMP klónt használtuk.

### 3. 10. 5. Ns-CMV és Rs-CMV rekombináns klónok készítése

Az Ns-CMV és az Rs-CMV között a mindkét klónban azonos pozícióban meglévő *BsmI*, *Csp45I*, *EcoRV* illetve a T7 promóter előtt levő *ApaI* illetve a klón 3' vég után elhelyezkedő *BamHI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyek felhasználásával készítettünk rekombináns klónokat. Először az *EcoRV*, a *BamHI*, illetve az *ApaI* helyek felhasználásával mintegy elfeleztük az eredeti klónokat (pNR, pRN). Következő lépésben az előző rekombináns klónok két *BsmI* restrikciós hasítóhely közé eső szakaszait cseréltük ki, így egy-egy mozaik szerkezetű klónt kaptunk (pN.RNR, pR.NRN). Következő két klónban a középső

*BsmI* és az *EcoRV* restrikciós hasítóhely közé eső rész cseréje történt a két klón között (pRNR/*Bsm*, pRNR/*BsmI*), majd ezt a középső részt tovább szűkítettük a *Csp45I* és az *EcoRV* közötti régióra (pRNR/*Csp*, pNRN/*Csp*).

A további pontmutánsokat PCR vezérelte mutagenézissel állítottuk elő (pR/L456F, pR/R461C, pR/V462Q, pR/V467A, pR/H469R, pN/C461R, pN/C461P, pN/C461A, pN/C461N, pN/C461S, pN/C461E, pN/C461K, pN/C461R, nNΔ461).

### 3. 11. Inokulálás fertőzőképes klónokkal

#### 3. 11. 1. Növények inokulálása

*In vitro* transzkriptummal való fertőzéskor az inokuláláshoz használt keverék minden egyes vírus RNS-nek megfelelő *in vitro* RNS transzkriptumból 2-5 µg-ot tartalmazott növényenként 50 mM K-foszfát pufferben pH: 9,2.

#### 3. 11. 2. Protoplaszt inokulálás

A protoplasztokat nevelőkamrában tartott *N. clevelandii* növények teljesen kifejtett leveleiből izoláltuk Nagy és Maliga (1976) módosított eljárása szerint. A sejtfaalak elbontásához 0,4 M szacharózt, 0,7 % cellulázt és 0,25 % macerozimet tartalmazó K3 oldatot használtunk, melyet felhasználás előtt sterilre szűrtünk. A begyűjtött levelek fonákját ecset segítségével cellal bedörzsöltük, majd fonákkal lefelé az enzimes-szacharózos K3 oldatra úsztattuk. A leveleket az oldattal egy éjszakán keresztül, sötétben inkubáltuk. Következő reggel a kiúszott protoplasztokat tartalmazó oldatot szűréssel választottuk el a levelek maradványaitól, ezután 10 percig centrifugáltuk 100 g-vel. Az oldat felszínéről Pasteur-pipettával szívtuk le a protoplasztokat, melyeket kétszer W5 oldatban mostunk 50 g-vel 2 percig centrifugálva. A pelletet végül 0,6 M mannitot tartalmazó W5-ben mostuk (50 g/2 perc). A felülúszó eltávolítása után a sejteket annyi mannit tartalmú W5-ben vettük fel, hogy végső koncentrációjuk  $2,5 \times 10^6$  protoplaszt/ml legyen.

Két mikrogramm tisztított vírus RNS-sel, vagy *in vitro* RNS transzkriptummal transzfektáltunk 100 µl protoplaszt szuszpenziót Kroner és Ahlquist (1992) módszere alapján. A szuszpenzióhoz hozzáadtuk a 2 µg RNS-t, majd 200 µl 40 % polietilén-glikolt (Ms ≈ 1500) és 3 mM CaCl<sub>2</sub>-t tartalmazó oldatot. Óvatos keverés és 5 mp várakozás után 2 ml mannitot tartalmazó W5-tel hígítottuk fel a szuszpenziót majd 15 percig jégen inkubáltuk. Az inkubálás után a sejteket lecentrifugáltuk (50 g/2 perc), végül a pelletet 1 ml 0,4 M glükóz tartalmú K3 oldatban szuszpendáltuk fel.

A protoplasztokat 24 óráig inkubáltuk növénynevelő kamrában. Az össznukleinsav kivonás előtt a sejteket finoman lecentrifugáltuk (65 g/5 perc), a felülúszót leöntöttük.

### **3. 12. A vírusfertőzés detektálása**

#### **3. 12. 1. RT/PCR detektálás**

A vírusfertőzés detektálását össznukleinsav kivonatból végeztük. A komplementer DNS szál szintézisét specifikus 3' vég primer jelenlétében M-MuLV reverz transzkriptázzal végeztük (Fermentas) 1 órán át 42 °C-on. A PCR reakciót specifikus primerpár jelenlétében, végeztünk: 30 cikluson keresztül (40 mp denaturálás 94 °C, 40 mp anellálás 50 °C, 1 perc szintézis 72 °C) A PCR terméket Roche "High Pure PCR Product Purification Kit"-tel tisztítottuk, majd nukleinsav sorrendjét meghatároztattuk.

#### **3. 12. 2. Northern analízis**

Körülbelül 5 µg össznukleinsavat formaldehid és formamid tartalmú mintafelvivő pufferben denaturáltunk 65 °C-on. Az elektroforézis formaldehid tartalmú agaróz gélben történt. A nukleinsavakat Hybond-N nejlon membránra (Amersham-Pharmacia) vittük át, UV fényel keresztkötöttük (70 mJ/cm<sup>2</sup>), majd a membránt Northern-hibridizációnak vetettük alá (Sambrook és mtsai., 1989). A <sup>32</sup>P-ral jelölt radioaktív próbát az CMV, TAV vagy PSV megfelelő klónjairól szintetizáltuk HexaLabel kittel (Fermentas). A membrán radioaktivitását tároló

foszfor lappal és a hozzá tartozó leolvasóval (Molecular Dynamics) tettük láthatóvá.

### 3. 12. 3. Western blot analízis

Western blot analízissel mutattuk ki a vírus köpenyfehérje jelenlétét fertőzött növényekben. A fertőzött és a kontroll növények leveleiből fehérjekivonatot készítettünk, denaturáltuk, majd 0,1 %-os SDS-t tartalmazó 12,5 %-os poliakrilamid gélen elválasztottuk (Laemmli, 1970), majd elektroblottolással átvittük Hybond-C-extra (Amersham) membránra. A köpenyfehérje detektálására alkalikus foszfatáz enzimmal konjugált köpenyfehérje ellenanyagot használtunk Hibi és Saito (1985) szerint.

### 3. 12. 4. Press blott hibridizáció

*N. clevelandii* növények két átellenes, teljesen kifejlődött fertőzött levelét az inokulálást követő 1, 3 és 5 nappal, a szisztemikusan fertőzött leveleket 3, 5 és 7 nappal az inokulálás után gyűjtöttük be a növényről. A levelek fonákját pengével egymásra merőleges vágásokkal óvatosan megsértettük, majd – a sértett felülettel érintkezve – Hybond-N nejlon membránra helyeztük. A levélnedvet több réteg Whatman szűrőpapír között hengerrel préseltük a nejlon membránra. A levél maradványait öblítéssel távolítottuk el kétszeres töménységű SSC pufferben (SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrát, pH: 7,2). Szárítás után a nukleinsavakat UV fényel (120 mJ/cm<sup>2</sup>) kötöttük a membránhoz. A vírus RNS-ek kimutatásának további lépései megegyeztek a Northern analízisnél leírtakkal.

### 3. 13. Nukleinsav szekvenciák meghatározása

A vizsgált nukleinsav szekvenciákat a Biomi Kft ABI 3100 Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystem) standard szekvenáló módban határozták meg.

### **3. 14. Bioinformatikai vizsgálatok**

#### **3. 14. 1. Nukleinsav sorrendek összehasonlítás és filogenetikai elemzése**

A különböző cucumovírusok fehérjéinek törzsfájának elkészítéséhez a rendelkezésünkre álló cDNS nukleotid sorrendeket először aminosav sorrenddé írtuk át, majd ezt használtuk a további vizsgálatokhoz.

A szekvenciák feldolgozásához a Wisconsin Package version 10.0 GCG, a Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) és T-coffee ([http://igs-server.cnrs-rs.fr/~cnotred/Projects\\_home\\_page/t\\_coffee\\_home\\_page.html](http://igs-server.cnrs-rs.fr/~cnotred/Projects_home_page/t_coffee_home_page.html)), a TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) a törzsfák megjelenítéséhez, valamint az Emboss-Align és a Clustal X (Thomson és mtsai., 1997) programcsomagokat használtuk és az EMBL/NCBI nemzetközi adatbankban elérhető szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A Clustal X programmal Neighbor-Joining eljárással a TreeView 1.6.6. (Page, 1996) felületén az adatokból filogenetikai törzsfát készítettünk. A filogenetikai vizsgálatok során a statisztikai megbízhatóságot a Clustal X program 1000 ismétlést alkalmazó bootstrap analízise biztosította.

#### **3. 14. 2. Rekombinációs vizsgálatok**

A nemzetközi adatbankokban fellelhető PSV szekvenciákra épülő rekombinációs vizsgálatokhoz az általánosan használt és elfogadott TOPALi v2 (Milne és mtsai., 2004) programcsomag PDM (Probabilistic Divergence Measures) analízisét alkalmaztuk (ablak méret: 200 nt, ablak elmozdulásának mérete: 10 nt) 95 %-os szignifikancia szinten.

#### **3. 14. 3. Homológia modellezés, elektrosztatikus potenciál számítás**

A fehérje modellek a MODELLER 6.1 program (Sali, 1995) segítségével készültek, templátként az Fny-CMV B alegységének szerkezetét használva. A szekvencia összerendezések a Wisconsin Package Version 10.0 programcsomaggal készültek. A homológia modellek finomítása a Kollman-All-Atom elnevezésű



(Kollman atomi töltéseket tartalmazó) fehérjékre kifejlesztett erőteret alkalmaztuk (Weiner és mtsai., 1984), a SYBYL 6.5 (1988) programcsomag felhasználásával.

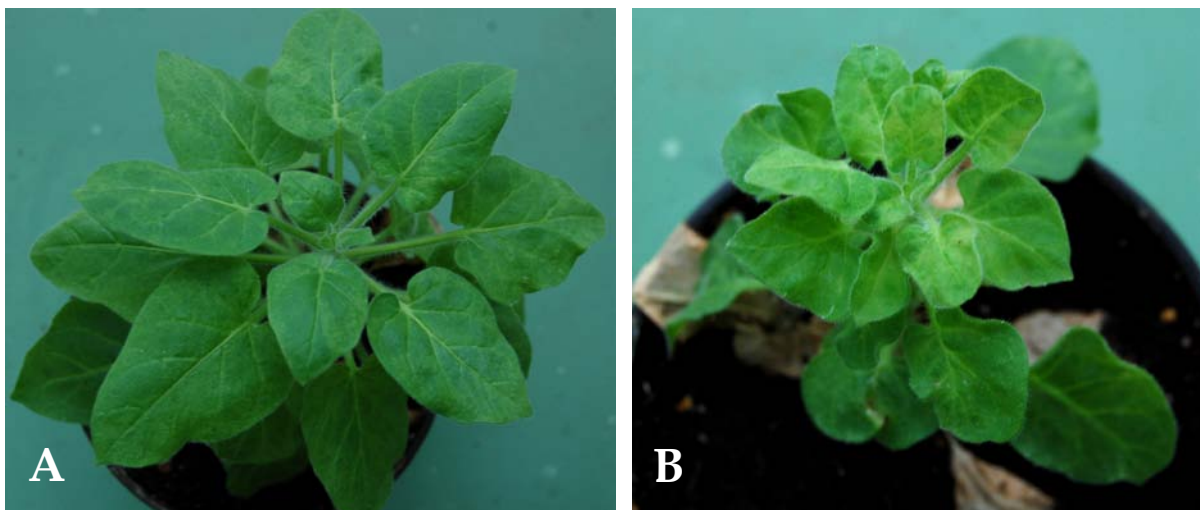
A modellek elektrosztatikai mintázatának számítása a linearizált Poisson-Boltzmann implicit módszerrel történt (Gilson és mtsai., 1987; Honig és Nicholls, 1995). A kontinuum fázis ionerősségét 0,1 mol/l-re, dielektromos állandóját  $\epsilon=80$ -ra, míg a fehérje belsejére vonatkozó értéket  $\epsilon=4$ -re voltak beállítva. A fehérjemodellben az összes lizin és arginin oldallánc egyszeres pozitív töltést, míg az összes glutamát és aszpartát oldallánc egyszeres negatív töltést viselt. Az atomok töltését a GRASP program segítségével számoltuk (Nicholls és mtsai., 1991). A molekuláris grafikai munkák és az elektrosztatikus potenciál ábrázolások a Swiss PDB Viewer 3.7 (Guex és Peitsch, 1997) programmal készültek.

#### 4. EREDMÉNYEK

##### 4. 1. CMV által indukált törpülés *Nicotiana glutinosa*-n

###### 4. 1. 1. Tünettani vizsgálatok

Különböző CMV izolátumok tünetei jelentősen eltérhetnek egymástól. A CMV II. alcsoportjába tartozó Trk7-CMV és R-CMV a legtöbb gazdanövényen (pl. *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. benthamiana*, *Capsicum annum*, *Cucumis sativus*, *Solanum Lycopersicum*) hasonló tüneteket okoz, azonban *Nicotiana glutinosa* növényeken jelentős különbséget figyeltünk meg. Míg a Trk7-CMV zöld mozaik tüneteket indukált (6. A ábra), addig az R-CMV-vel fertőzött növényeken súlyos törpülést és levéldeformációt figyeltünk meg (6. B ábra). A törpülést mutató *N. glutinosa* növény levelein az epidermisz illetve mezofil sejtek mérete a toulidinkékkel festett 1 µm-es metszeteken normálisak voltak, ami arra utalt, hogy a törpülés kialakításában nem a sejtnövekedés, hanem a sejtosztódás gátlásának van döntő szerepe.

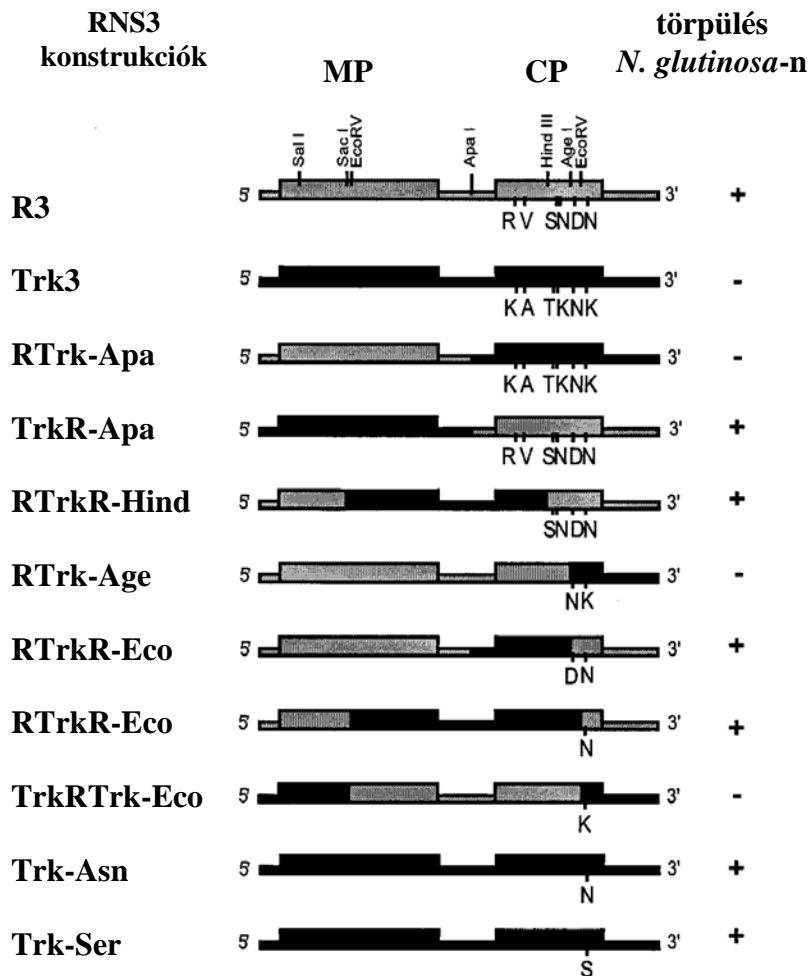


6. ábra A Trk7-CMV (A) és az R-CMV (B) által okozott tünetek *N. glutinosa* növényeken.

#### 4. 1. 2. A törpülés tünet kialakításának genetikai háttere

Mind a Trk7-CMV izolátum, mind az R-CMV izolátum fertőzőképes klónjaival rendelkezünk, így első lépésben reasszortáns vírusok fertőzési tulajdonságainak vizsgálatával lokalizáltuk a törpülési tünetek kialakításáért felelős genomi RNS-t. Megállapítottuk, hogy minden olyan genomi RNS kombináció mely az R-CMV hármast tartalmazza (R1R2R3, R1Trk2R3, Trk1R2R3, Trk1Trk2R3) törpülést indukál, míg ha az R-CMV hármast nem volt jelen (Trk1Trk2Trk3, Trk2R2Trk3, R1Trk2Trk3, R1R2Trk3) mozaik tüneteket figyeltünk meg. Így egyértelművé vált, hogy a törpülést determináló különbség az RNS3-on lokalizálódik.

A genetikai determináns pontos lokalizációjához a két vírus RNS3 fertőzőképes klónjait felhasználva rekombináns RNS3 molekulákat készítettünk. Első lépésben az RNS3-on lokalizálódó két gén (MP és CP) között található *Apa*I restrikciós endonukleáz hasítóhelyet felhasználva készített rekombináns segítségével meghatároztuk, hogy a törpülés genetikai determinánsa a köpenyfehérjén lokalizálódik. Az R-CMV és a Trk7-CMV köpenyfehérjéi között hat aminosav eltérés található. Az *Age*I restrikciós enzim felhasználásával olyan rekombináns készítettünk, melyben az amino-terminális 4 aminosavnyi különbséget (R, V, S, N) a karboxi-terminális 2 különbségtől (D, N) elválasztottuk (7. ábra). A fertőzési kísérletek során megállapítottuk, hogy a törpülésben a karboxi-terminális különbségeknek van döntő szerepe. A továbbiakban irányított mutagenézissel mind az R-CMV, mind a Trk7-CMV RNS3-ban megváltoztattuk az érintett aminosavakat, és megállapítottuk, hogy a törpülés kialakításáért egyértelműen a 193-as aminosav a felelős. Amennyiben ebben a pozícióban aszparagin található, a törpülés a többi genomi különbségtől függetlenül kialakul, míg ha ebben a pozícióban lizin található, mozaik tünetek jelennek meg.



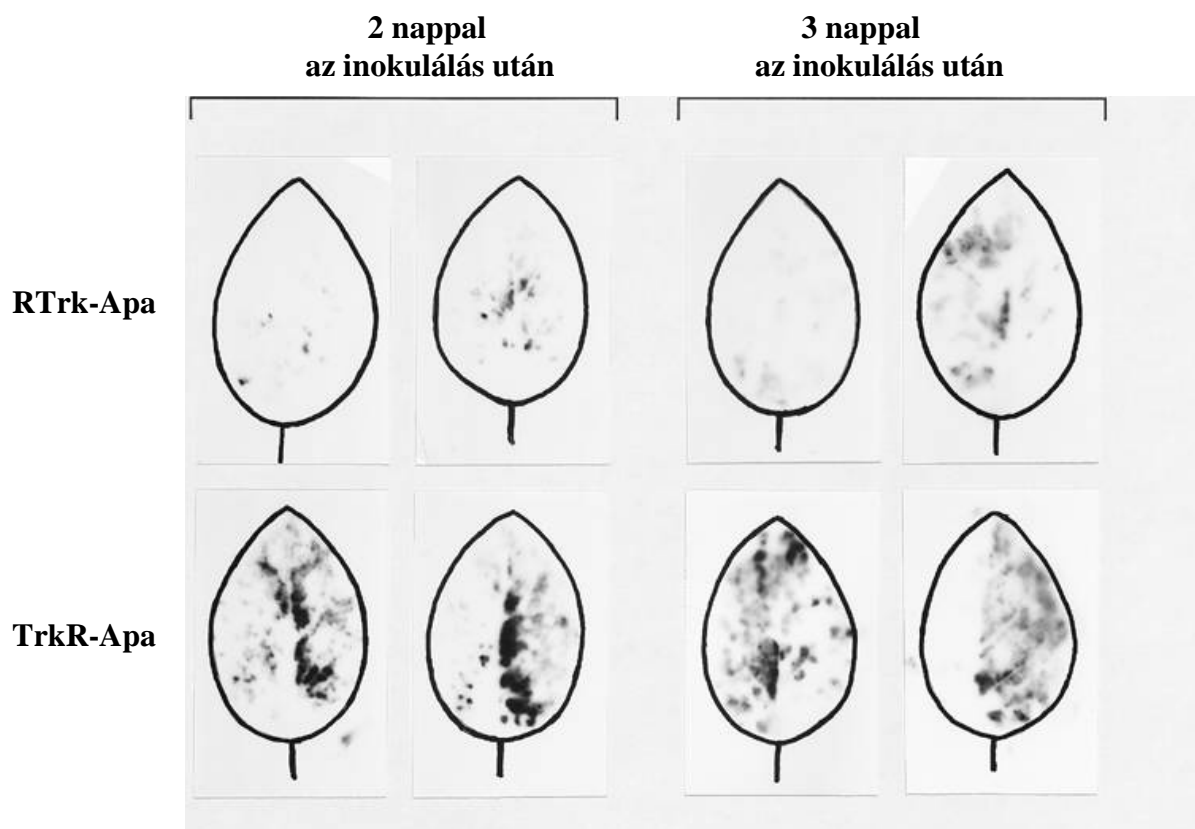
**7. ábra** A Trk7-CMV, az R-CMV, a rekombináns és a mutáns RNS3 klónok sematikus ábrázolása. (Jobb oldalon a *N. glutinosa* tesztnövényen indukált törpüléssel tünet megjelenését vagy hiányát jelöltük, a CP-ben az aminosav eltéréseket az aminosavak egybetűs kódjával jelöltük.)

#### 4. 1. 3. A vírusfertőzés kinetikájának és a vírus akkumulációjának vizsgálata

A két, különböző tüneteket okozó izolátum fertőzésének folyamatát, a vírusok jelenlétét, az inokulált levelekben press-blott hibridizációval, a szisztémikusan fertőződő levelek nyelében Western blott analízissel, míg a szisztémikusan fertőzött levelekben Northern hibridizációval és Western blott analízissel követtük nyomon.

A kísérletekhez a *Nicotiana glutinosa* növényeket azonos koncentrációjú, tisztított vírussal inokuláltuk. Az inokulumok fertőzésének hatékonyságát

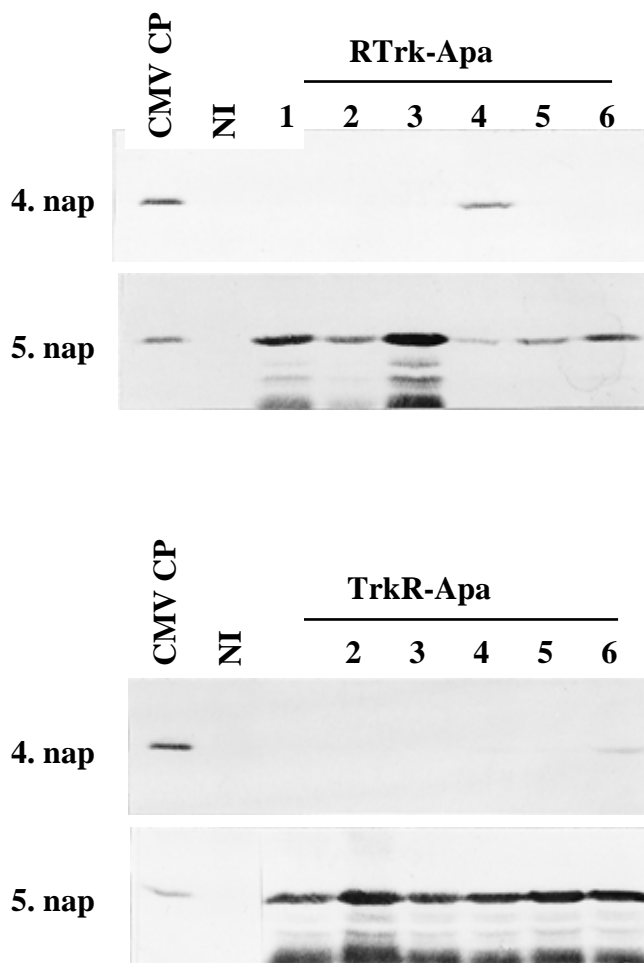
előzetesen *Chenopodium quinoa* növényeken ellenőriztük. Mindkét inokulum ugyanannyi léziót indukált a lokális gazdanövényen, így megállapítottuk, hogy a fertőzőképességük megegyezik. A mintákat a fertőzött *Nicotiana glutinosa* növények inokulált leveleiből naponként szedtünk. Megállapítottuk, hogy az inokulált levelekben az RTrk-Apa konstrukció (ami nem indukál törpülést) lényegesen kisebb mennyiségben halmozódik fel, mint a TrkR-Apa, törpülést indukáló rekombináns vírus (8. ábra). Az inokulált levelekben a víruskoncentráció a fertőzést követő harmadik nap után már nem változik.



**8. ábra** A különböző tüneteket okozó CMV rekombinánsok terjedése az inokulált levelekben két illetve három nappal az inokulálás után.

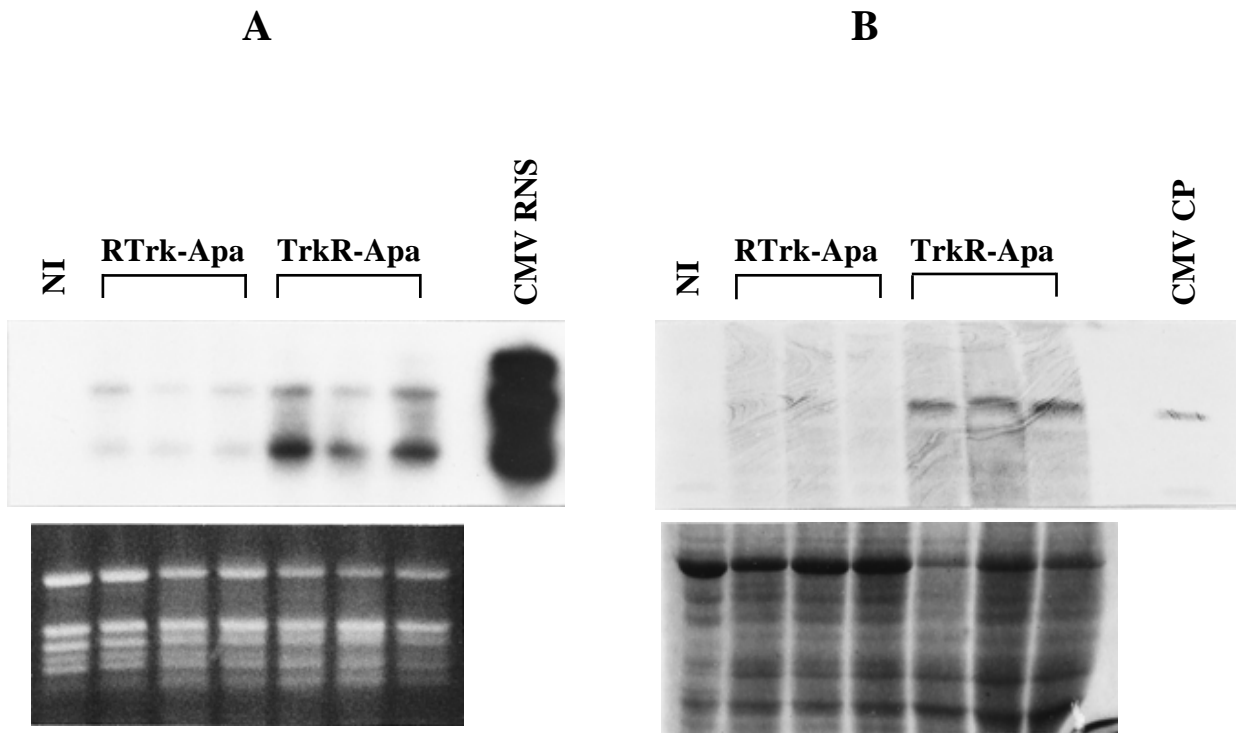
A vírus megjelenésének ütemét a fertőzött levelek nyelében is vizsgáltuk. A levélnyelben mindkét esetben a 4. napon tudtuk detektálni először a vírust, míg az 5. napon már az összes vizsgált levélnyelben jelen volt a vírus. Tehát a kimérák floémában történő megjelenésének időpontjában nem találtunk különbséget, azonban a TrkR-Apa konstrukció általában itt is nagyobb koncentrációban halmozódott fel (9. ábra).

dc\_341\_11



**9. ábra** A rekombináns vírusok megjelenése a fertőzött levelek nyelében. A vírus megjelenését Western blott analízissel vizsgáltuk, 4, ill. 5 nappal az inokulálás után. Bal oldalon tisztított CMV pozitív, ill. mellette nem inokulált (NI) negatív kontroll, egészséges növényi fehérje kivonat található.

A felső, nem fertőzött levelekben a rekombináns vírusok megjelenését vizsgálva megállapítottuk, hogy a rekombinánsok ugyanabban az időpontban, 5-6 nappal a fertőzés után mutathatók ki, de koncentrációjuk itt is eltérő. Northern analízissel a vírus RNS-t, Western analízissel pedig a köpenyfehérjét vizsgálva megállapítottuk, hogy az RTrk-Apa rekombináns vírus lényegesen kisebb mennyiségben halmozódott fel, mint a TrkR-Apa rekombináns (10. ábra).



**10. ábra** Vírus RNS (A) illetve köpenyfehérje (B) akkumulációja *N. glutinosa* növény szisztémikusan fertőzött leveleiben 6 nappal a fertőzés után. A jelölt próba az R-CMV RNS3 3' terminális régiójával volt komplementer. Az ethidiumbromiddal festett riboszómális RNS-ek, illetve a Tholuidin kékkel festett teljes fehérje kivonatok a blottok alatt kerülnek bemutatásra. (tisztított R-CMV RNS és CMV CP pozitív kontrollok, NI-nem inokulált növényi kivonat, negatív kontrollként.)

A kísérleteket *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi növényeken is megismételtük, ahol a két vírus hasonló, mozaik tüneteket indukál. Megállapítottuk, hogy a fertőzés kinetikája ebben az esetben is hasonló a két izolátum esetén, de a víruskoncentrációban megfigyelt különbség ebben az esetben is megfigyelhető volt. Így *N. glutinosan* az indukált tünetekben megfigyelt különbséget nem okozhatja magában a vírus felhalmozódásban megfigyelt különbség (Szilassy és mtsai., 1999a).

#### 4. 1. 4. A 193-as aminosav jósolt funkciója a köpenyfehérje szerkezeti vizsgálatok alapján

Az uborka mozaik vírus izolátumok közül egyedül az Fny-CMV köpenyfehérje szerkezete ismert, de ezt templátként használva elkészíthettük a

Trk7-CMV és az R-CMV izolátumok köpenyfehérjéinek homológia modelljét. A nagyfokú hasonlóságnak köszönhetően a modellezett szekvenciárész összerendezésében nem kellett réseket nyitni és beszúrásokra sem volt szükség (11. ábra). Az R és a Trk7-CMV CP-t a 29. aminosavtól a C-terminális végéig a 218 aminosavig modelleztük. A templátként használt Fny-CMV CP röntgendiffrakciós szerkezet nem tartalmazza az első 28 aminosavat, mivel az N-terminális régió a vírus RNS kötés miatt rendezetlen szerkezetű. A homológia modellek megbízhatóságát sztereokémiai statisztikai mutatók igazolták, melyek részleteire itt nem térnek ki.

|          |     |                                      |                                  |                 |                              |     |             |
|----------|-----|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------------|-----|-------------|
| R-CMV    | 1   | MDKSGSPNASRTSRRRRPRRGRSRSASGADAGLRAL | TQQMLKLN                         | R               | TLAIGRPTLNHPTF               | V   | G           |
| Trk7-CMV | 1   | MDKSGSPNASRTSRRRRPRRGRSRSASGADAGLRAL | TQQMLKLN                         | K               | TLAIGRPTLNHPTF               | A   | G           |
| R-CMV    | 61  | SESCKPGYTF                           | TSITLKPPEIEKGSYFGRRLSLPDSVTDYDKK | L               | VSRIQIRINPLPKFDST            |     |             |
| Trk7-CMV | 61  | SESCKPGYTF                           | TSITLKPPEIEKGSYFGRRLSLPDSVTDYDKK | Q               | VSRIQIRINPLPKFDST            |     |             |
| R-CMV    | 121 | VWVTVRKVPSSSDL                       | SVAAT                            | S               | AMFGDGNSPVLVYQYAASGVQANNKLLY | D   | LSEMRADIGDM |
| Trk7-CMV | 121 | VWVTVRKVPSSSDL                       | SVAAT                            | T               | AMFGDGKSPVLVYQYAASGVQANNKLLY | N   | LSEMRADIGDM |
| R-CMV    | 181 | RKYAVLVY                             | SKDDN                            | LEKDEIVLHVDVEHQ | RIPISRMLPT                   | 218 |             |
| Trk7-CMV | 181 | RKYAVLVY                             | SKDDK                            | LEKDEIVLHVDVEHQ | RIPISRMLPT                   | 218 |             |

**11. ábra** Az R-CMV és a Trk7-CMV köpenyfehérjéinek összehasonlítása. Az eltérő aminosavakat sárga színnel, a Kazein kináz II (CKII) enzim felismerő helyet pirossal jelöltük.

Az R-CMV CP aszparagin (N) a Trk7-CMV CP pedig lizin (K) található a 193-as pozícióban. A 193-as aminosav a H és az I béta-redő közötti  $\beta$ H- $\beta$ I hurok régióban helyezkedik el.

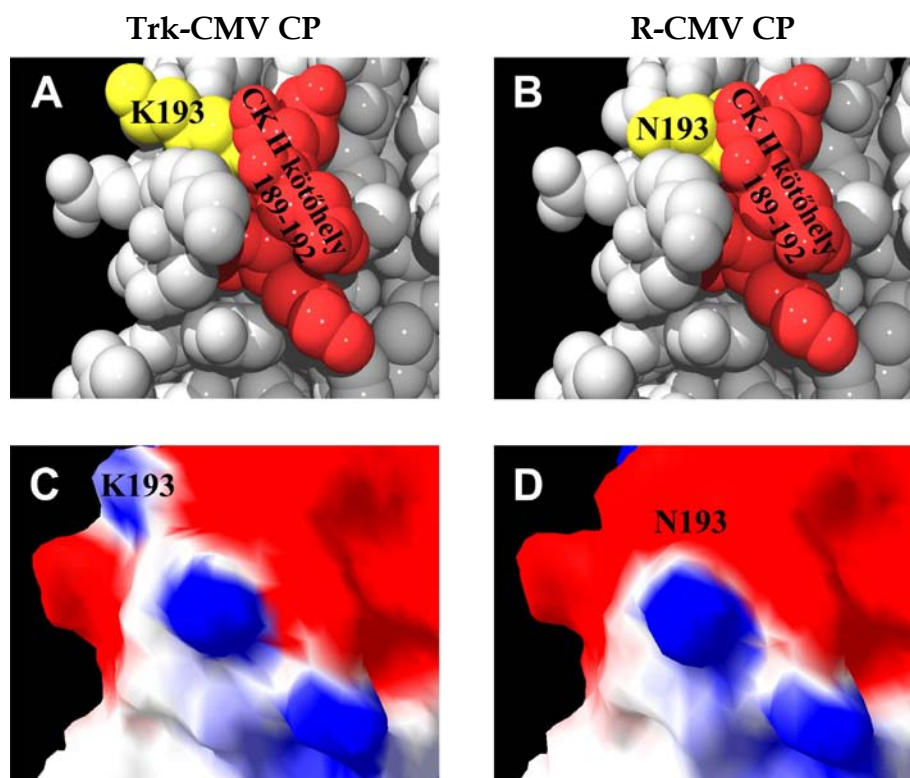
A funkcionálisan fontos helyek vizsgálatát a PROSITE elnevezésű programmal végeztük. A Trk7-CMV és az R-CMV CP modelljeit összehasonlítva és a funkcionális hely jóslás eredményeit figyelembe véve megállapítható, hogy a 193-as pozíciót közvetlen megelőzve a 189-192 aminosavig terjedő szekvenciárészen (SKDD) egy kazein kináz II (CK II) foszforilációs hely található (12. A, B ábra). Feltételezhető hogy a 193-as aminosav töltése befolyásolja a kináz kötődését a köpenyfehérje felületén. Az elektrosztatikus potenciál felületi eloszlása alapján a K193 természetesen pozitív töltésű, míg az N193 negatív polaritású (12. C, D ábra). Ez a kis eltérés azonban két különböző biokémiai utat



indukálhat a vírusfertőzés folyamatában. A modellszerkezeteket megvizsgálva azt is megállapíthatjuk, hogy a szóban forgó foszforilációs hely a víruspartikulum felületén helyezkedik el, így hozzáférhetősége miatt az összeépült vírusrészecskében is végbemehet a foszforilálódás.

A foszforiláció pontos helye a homológiamodell alapján nem határozható meg. Feltételezhető, hogy a 188-as pozícióban található, minden CMV izolátumnál megtalálható tirozin (Y), vagy a köpenyfehérje 189-es aminosav pozíciójában elhelyezkedő szerin (S) foszforilálódhat ami a vírus által indukált tünetek kialakításában kulcsfontosságú (Gellért és mtsai., 2006).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy bizonyítottuk az uborka mozaik vírus köpenyfehérjéjének egyetlen aminosava (193 as) felelős a törpülésszerű tünetek kialakításáért, és a tünetek változásában valószínűleg a fehérje foszforilációs állapotának változása játszik szerepet.



**12. ábra** A Trk7-CMV és az R-CMV köpenyfehérje szerkezeti elemzése a 193-as pozíció környezetében. (A, B): A Trk7-CMV és az R-CMV köpenyfehérje van der Waals felületének ábrázolása a 193-as aminosav és a CK II foszforilációs hely jelölésével. (C,D): A Trk7CMV és az R-CMV köpenyfehérje elektrosztatikus potenciáljának megjelenítése ugyanabból a nézetből. A piros területek  $-1,8$  kT-nél kisebb, a fehér  $0,0$  kT, a kék pedig  $+1,8$  kT-nél nagyobb elektrosztatikus potenciálú felületet takarnak.

## 4. 2. A cucumovírusok hosszú távú mozgásában kulcsfontosságú köpenyfehérje régió azonosítása uborka növényeken

### 4. 2. 1. Tünettani megfigyelések és rekombináns vírusok vizsgálata

Nem csak az uborka mozaik vírus különböző izolátumai között figyelhetünk meg fontos tünettani különbségeket, hanem a különböző cucumovírusok között is. Míg a CMV izolátumok, mint azt nevük is jelzi, szisztemikusan fertőzik az uborkát, addig a különböző TAV izolátumok egyáltalán nem, vagy csak lokálisan fertőzik. Korábbi munkánk során igazoltuk reasszortáns és rekombináns vírusok segítségével, hogy a TAV köpenyfehérjéje nem teszi lehetővé a rekombináns vírus hosszú távú mozgását uborka növényen (13. ábra), míg más gazdanövényeket (pl. *N.tabacum* cv. Xanthi-nc, *N. benthamiana*) a rekombináns vírus szisztemikusan fertőz (Salánki és mtsai., 1997). Vizsgálatainkhoz az R-CMV és a P-TAV izolátumokat használtuk fel.



R-CMV

RNS1  
RNS2  
RNS3 (MP, CP)



rekombináns

RNS1  
RNS2  
RNS3 (MP, CP)



P-TAV

RNS1  
RNS2  
RNS3 (MP, CP)

**13. ábra** Uborka növényeken megfigyelhető tünetek 10 nappal az inokulálás után. A növények R-CMV-vel, rekombináns RNS3-t tartalmazó vírussal (Trk12RT) illetve P-TAV-val voltak fertőzve.

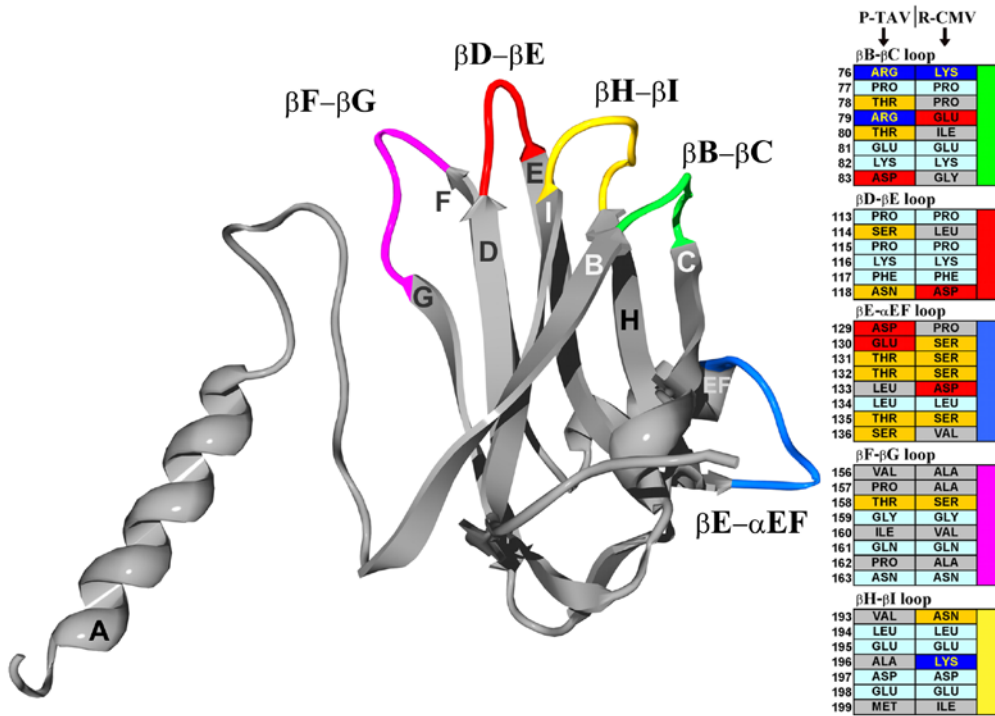
#### 4. 2. 2. A köpenyfehérje hurokrégióinak vizsgálata

A cucumovírusok hosszú távú mozgása víruspartikulum formájában történik a fertőzött növény szállítószövet rendszerén keresztül, így további vizsgálatainkat a köpenyfehérje víruspartikulum felszínén található hurokrégióira koncentráltuk.

Mind a CMV CP-nek, mind a TAV CP-nek ismert a röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott térszerkezete, és ezek nagyon hasonlítanak egymásra. A két köpenyfehérjét összehasonlítva meghatároztuk azt az 5-5 hurokrégiót, amely a víruspartikulum felületén lokalizálódik (14. ábra). Az R-CMV öt hurokrégióját egyesével a TAV megfelelő hurok részeivel helyettesítettük, így öt rekombináns klónt készítettünk. A  $\beta$ B- $\beta$ C loop mutáns esetében 5 aminosavat, a  $\beta$ D- $\beta$ E loop esetén 2 aminosavat, a  $\beta$ E- $\alpha$ EF loop mutánsnál 7 aminosavat, a  $\beta$ F- $\beta$ G loop esetén 5 aminosavat, míg a  $\beta$ H- $\beta$ I loopnál 3 aminosavat cseréltünk ki. A rekombináns fertőzőképes klónok felhasználásával a CMV RNS1 és 2 transzkriptumok jelenlétében *N. clevelandii* növényeket fertőztünk. Mivel a *N. clevelandii* tesztnövény közös szisztémikus gazdanövénye a két vírusnak, várakozásainknak megfelelően 6-10 nappal a fertőzést követően mindegyik esetben szisztémikus tüneteket figyeltünk meg. A rekombináns vírusokat tisztítottuk, majd RT/PCR reakciót követően meghatároztuk a vírus köpenyfehérje génjének nukleinsav sorrendjét. A beépített mutációk minden esetben stabilnak bizonyultak. A további kísérletekhez tisztított viriont használtuk 50 mg/ml koncentrációban.

A tisztított, rekombináns vírusokkal uborka növények sziklevelét inokuláltuk, majd a tünetek megjelenését hat héten át követtük nyomon vizuálisan, RT/PCR technikával illetve Northern analízissel. A fertőzési kísérleteket öt alkalommal, legalább 8-8 növény felhasználásával végeztük el. Megállapítottuk, hogy a  $\beta$ B- $\beta$ C loop mutáns kivételével a rekombinánsok szisztémikusan fertőzték az uborkát, és a legtöbb mutáns által indukált tünet az eredeti CMV fertőzéshez hasonlóak voltak. A  $\beta$ E- $\alpha$ EF mutáns mutatott egyedül eltérést a vad típusú R-CMV-hez képest. Ennél a rekombinánsnál a tünetek két nappal később jelentek meg, és gyengébbek is voltak.

dc\_341\_11

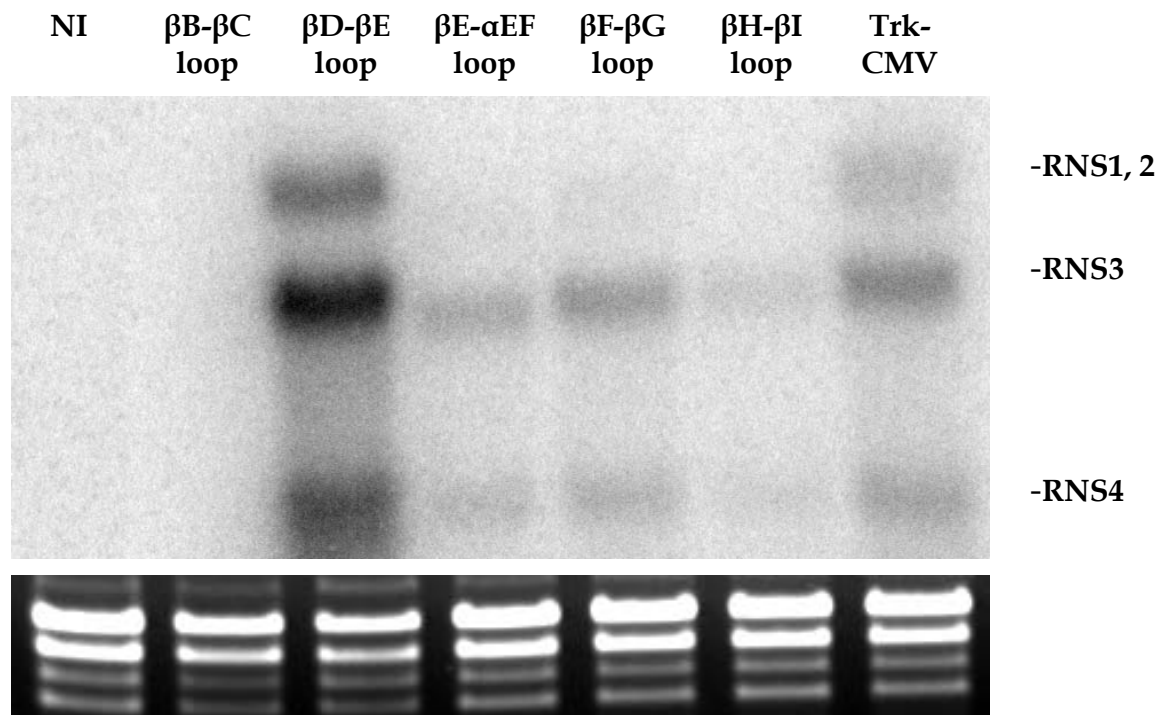


**14. ábra** A cucumovírusok felszíni hurokrégióinak lokalizációja a köpenyfehérje alegységen, illetve a hurok régiók eltéréseinek összehasonlítása P-TAV és R-CMV között.

Az RT/PCR analízist követő nukleinsav sorrend meghatározás során megállapítottuk, hogy a mutánsok nukleinsav sorrendje nem változott, stabil maradt az uborka növények fertőzésekor is. A  $\beta$ B- $\beta$ C loop mutánsal történt inokulálás során az inokulált leveleken megfigyeltünk lokális léziókat, azonban szisztémikus tünetek egyetlen esetben sem alakultak ki, és sem RT/PCR reakció, sem Northern analízis során nem tudtuk a vírus jelenlétét kimutatni a csúcsi, nem fertőzött levelekben (15. ábra).

Így megállapítottuk, hogy a  $\beta$ B- $\beta$ C loop régiónak kulcsszerepe van a cucumovírusok hosszú távú mozgásában uborka növényeknél. Továbbiakban ezt a hurokrégiót vizsgáltuk részletesen.

dc\_341\_11



**15. ábra** A köpenyfehérje hurok régióinak cseréjével készített rekombinánsok Northern analízise uborka növények szisztemikusan fertőzött leveleiből. A jelölt próba a CMV RNS3 3' terminális régiójával volt komplementer. Az ethidiumbromiddal festett riboszómális RNS-ek a Northern blott alatt kerülnek bemutatásra. (NI-nem inokulált kontroll.)

#### 4. 2. 3. A $\beta$ B- $\beta$ C hurok részletes vizsgálata

A köpenyfehérje  $\beta$ B- $\beta$ C loop régiójában 5 aminosav eltérés figyelhető meg a CMV és a TAV között. Ezeket az eltéréseket a továbbiakban egyesével vizsgáltuk, öt olyan mutánst készítve, melyben az R-CMV klónban egy-egy aminosavat változtattuk meg a megfelelő P-TAV aminosavra. A következő pontmutáns klónokat készítettük: pR3K76R, pR3P78T, pR3E79R, pR3E79A, pR3G83D, valamint készítettünk egy kettős (pR3EI79-80RT), és egy hármas mutációt (pR3PEI78-80TRT) tartalmazó klónt is. A mutáns klónokról készült transzkriptumokkal CMV RNS1 és 2 transzkriptumok jelenlétében *N. clevelandii* növényeket inokuláltunk. A mutáns klónok közül mindegyik szisztemikusan fertőzte a *N. clevelandii* teszt növényeket. A szisztemikus tünetek 6-8 nappal a fertőzés után jelentkeztek, és a legtöbb esetben nagyon hasonlítottak az R-CMV

által okozott tünetekre. Egyedül az R3E79R mutáns indukált az eredeti R-CMV-nél lényegesen erősebb tüneteket.

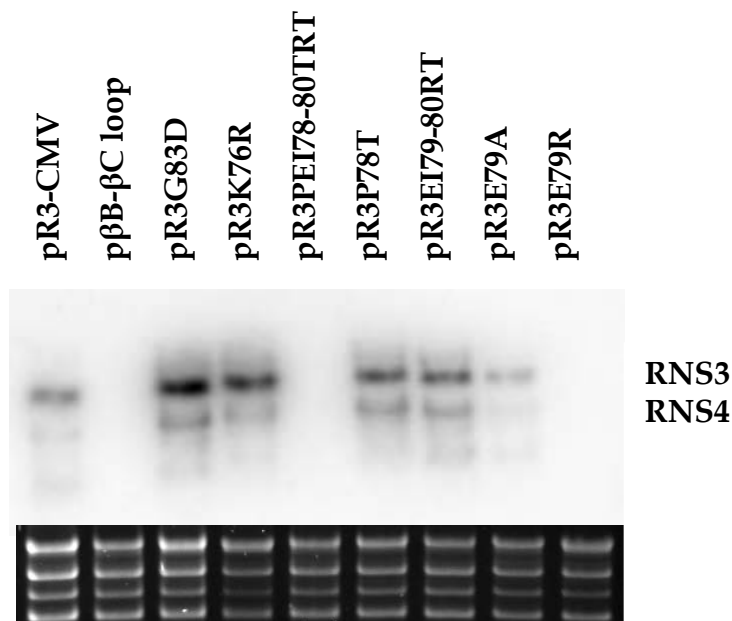
A mozaik tüneteken kívül erős törpülést és levéldeformációt figyeltünk meg. A szisztemikusan fertőzött levelekben történő vírus RNS akkumulációban ez a mutáns (R3E79R) vírus sem mutatott eltérést a vad típushoz képest. A mutáns virionokat tisztítottuk, majd RT/PCR reakciót követően meghatároztuk a köpenyfehérje gén teljes nukleinsav sorrendjét. Megállapítottuk, hogy mindegyik beépített mutáció stabil volt, nem változott meg a beépített nukleinsav sorrend, illetve a köpenyfehérjében máshol sem keletkezett mutáció.

A tisztított virionokkal uborka növényeket fertőztünk. A kísérleteket három-három ismétlésben 9-9 növényvel végeztük el. A fertőzés után négy nappal mindegyik esetben megfigyeltünk lokális léziókat az inokulált leveleken, tehát a mutánsok sejtről-sejtre a vad típushoz hasonlóan tudtak terjedni. Szisztemikus tüneteket a R3K76R, R3P78T, R3E79A, R3G83D, R3EI79-80RT vírusok esetén figyeltünk meg, míg a R3PEI78-80TRT és R3E79R nem jelentek meg tünetek. Az uborka növények nem inokulált leveleinek Northern analízise megerősítette a vizuális megfigyeléseinket (16. ábra), a  $\beta$ B- $\beta$ C loop rekombináns mellett a R3PEI78-80TRT és R3E79R mutáns vírussal fertőzött növény leveleiben nem tudtunk vírus RNS-t kimutatni.

Kísérleteink bizonyították, hogy ha az R-CMV CP  $\beta$ B- $\beta$ C loop részén található PEI aminosavakat a P-TAV CP azonos elhelyezkedésű TRT aminosavakra cseréljük, vagy az R-CMV CP 79-es pozíciójában lévő glutaminsavat a P-TAV CP-ben található argininra cseréljük, uborka növényben a mutáns vírus hosszú távú mozgása, szisztemizálódása gátolt. Tehát a CP 78-80 aminosavai kulcsfontosságúak a CMV uborka növényen belüli hosszú távú mozgásában.

Felvetődött az a kérdés, hogy ha a P-TAV CP  $\beta$ B- $\beta$ C loop régióját a CMV megfelelő szakaszával helyettesítjük, lehetővé válik-e a mutáns vírus hosszú távú mozgása uborka növényen. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához elkészítettük a pT3TRT78-80PEI és a pRT3TRT78-80PEI konstrukciókat.

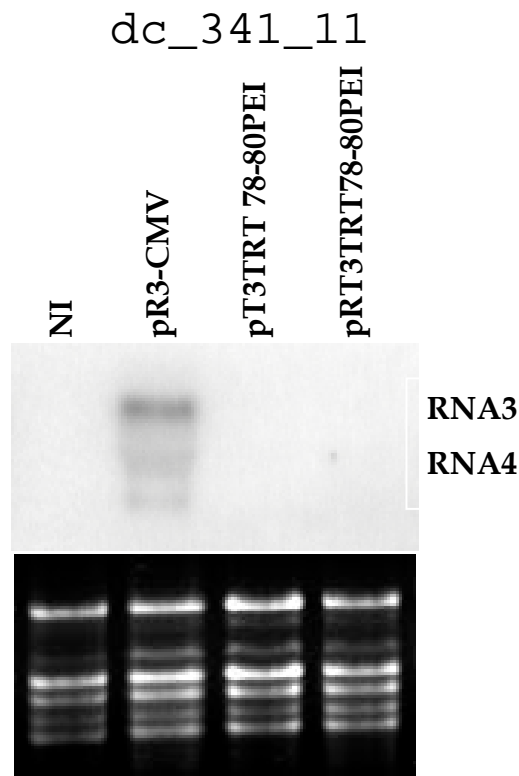
dc\_341\_11



**16. ábra** A pontmutánsok, a kettős és hármas mutánsok Northern analízise uborka növények szisztemikusan fertőzött leveleiből. A jelölt próba a CMV CP kódoló régiójával komplementer. Az ethidiumbromiddal festett riboszómális RNS-ek a Northern blott alatt kerülnek bemutatásra.

Míg a pT3TRT78-80PEI a CP módosítás a TAV RNS3 klónban történt, a pRT3TRT78-80PEI konstrukció a CMV MP-t tartalmazta a TAV CP mellett. Mindkét konstrukció fertőzőképességét először *N. clevelandii* növényen vizsgáltuk R-CMV RNS1 és 2 transzkriptum jelenlétében. Ezen a tesztnövényen mindkét konstrukció szisztemikus tüneteket okozott, és az RT/PCR reakció utáni nukleinsav sorrend meghatározás bizonyította a konstrukciók stabilitását. A fertőzött növényekből viriont tisztítottunk a további kísérletekhez. Uborka növények fertőzése során a T3TRT78-80PEI és a RT3TRT78-80PEI virionok csak lokális fertőzést indukáltak, szisztemikus tüneteket egyetlen esetben sem sikerült detektálnunk, amit a Northern analízis eredménye is igazolt (17. ábra).

Összességében megállapítottuk, hogy a cucumovírusoknál a βB-βC loop 3 aminosavból álló régiója kulcsfontosságú uborka növényen a szisztemikus terjedéshez, azonban nem ez az egyetlen funkcionálisan fontos régió, ami a hosszú távú terjedésben a különbséget okozza a CMV és a TAV között.



**17. ábra** A mutánsok Northern analízise uborka növények szisztemikusan fertőzött leveleiből. A jelölt próba a CMV és a TAV CP génekkel volt komplementer. Az ethidiumbromiddal festett riboszómális RNS-ek a Northern blott alatt kerültek bemutatásra. (NI-nem inokulált növényi kivonat, negatív kontrollként.)

#### 4. 3. A cucumovírusok sejtről-sejtre történő terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása

Régóta ismert, hogy különböző cucumovírusok között reasszortáns vírusok a természetben is előfordulhatnak, illetve mesterségesen is készíthetők. Már a fertőzőképes klónok felfedezése előtt is készítettek reasszortáns vírusokat, az egyes RNS-ek tisztításával és új kombinációban történő inokulálásával. Az ilyen, reasszortáns vírusok nagy előrelépést jelentettek az egyes RNS-ek és az általuk kódolt fehérjék tulajdonságainak, patológiai szerepének jellemzésében. A fertőzőképes klónok megjelenésével egyszerűbbé vált a reasszortáns vírusok készítése. Egyértelművé vált, hogy míg az RNS3 szabadon cserélhető a különböző cucumovírus izolátumok között, addig az RNS1 és 2 csak fajon belül variálható. Ugyanakkor a fertőzőképes klónok segítségével az azonos RNS-en kódolódó gének, esetünkben a hármas RNS-en kódolódó MP és CP is kicserélhetővé vált, ami ezeknek a fehérjéknek az elkülönített vizsgálatát is lehetővé tette. Korábbi



munkánk során megállapítottuk, hogy a CMV MP képes a TAV CP-vel életképes rekombináns vírust létrehozni, azonban a TAV MP a CMV CP-vel kombinálva csak egyes sejtekben replikálódik, azonban a fertőzött sejtekből a szomszédos sejtekbe átjutni már nem képes (Salánki és mtsai., 1997). Ebben az esetben a MP és a CP integritása és működőképessége nem kétséges, ezért feltételeztük, hogy a két fehérje szorosabb kölcsönhatása szükséges a sejtről-sejtre terjedéshez. Ebben a kölcsönhatásban szereplő régiók lokalizálását tűztük ki célul rekombináns MP-t és CP-t hordozó vírusok segítségével.

#### **4. 3. 1. Rekombináns köpenyfehérjét és mozgási fehérjét kódoló RNS3 klónok készítése**

A TAV és CMV mozgási- és köpenyfehérjében azonos pozíciókban nem találhatóak restrikciós endonukleáz hasítóhelyek, ezért első lépésként restrikciós hasítóhelyeket építettünk be a T3/NdeI és R3/NdeI fertőzőképes klónokba.

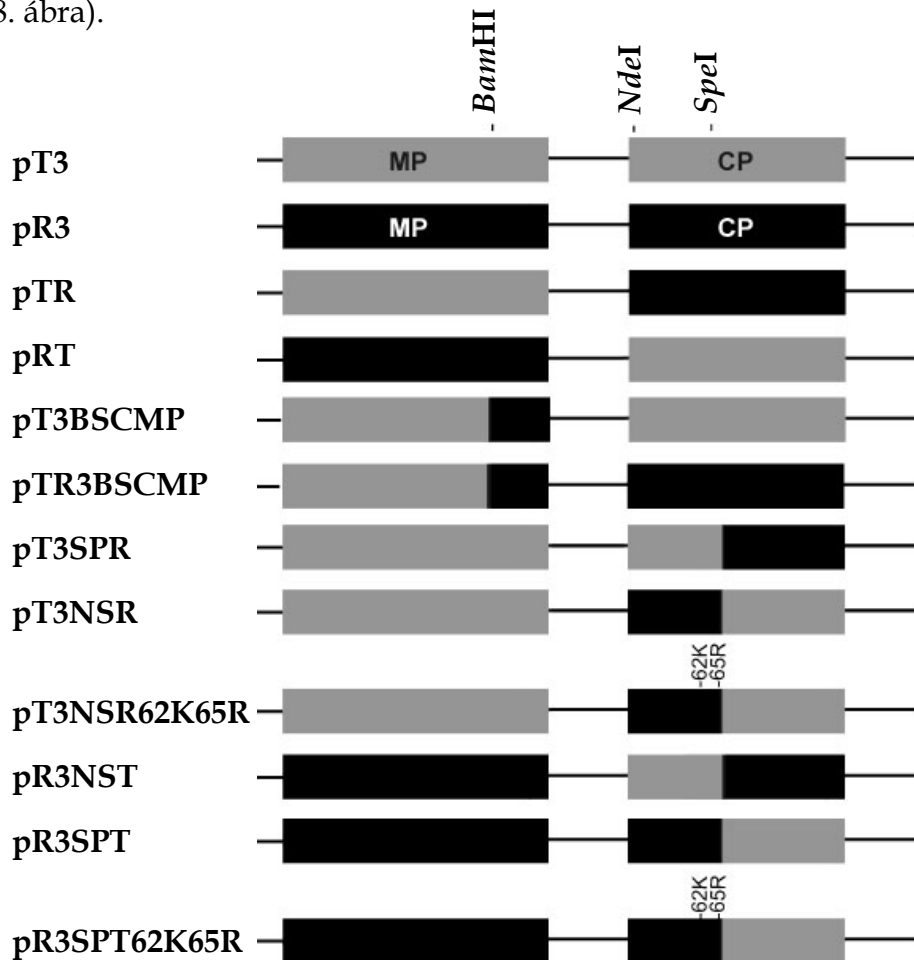
A CMV MP-ről ismert volt, hogy a C-terminális 33 aminosav hiányában egy másik vírusnemzetségbe tartozó vírus, a *Brome mosaic virus* sejtről-sejtre terjedését is képes támogatni (Nagano és mtsai., 1997), így első lépésként ennek a régiónak a vizsgálatát tűztük ki célul. Ehhez a MP C-terminális végétől a homológia viszonyokat tekintve egyenlő távolságra egy-egy *Bam*HI hasítóhelyet építettünk be a fertőzőképes klónokba csendes mutációval. A TAV esetén ez 30 aminosav, míg a CMV esetén 29 aminosav cseréjét tette lehetővé.

A köpenyfehérjék esetén a rekombinációs pontot a két vírus köpenyfehérjéinek aminosav sorrend homológia viszonyai alapján határoztuk meg. A két vírus CP-jének amino-terminális régiói kisebb homológiát mutattak (40,58 % az első 70 aminosav esetén) mint a C-terminális régió (63,33 % az utolsó 149 aminosavnál). Így egy *Spe*I restrikciós endonukleáz hasítóhelyet építettünk be csendes mutációval mindkét CP 149. aminosava után.

A csendes mutációkat hordozó fertőzőképes klónok fertőzőképességét a R-CMV RNS1 és 2 transzkriptummal kiegészítve vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a klónok fertőzőképessége nem változott, és az általuk kiváltott tünetek jellemzői és megjelenésüknek ideje sem változott a vizsgált gazdanövényeken (*N. clevelandii*,

*N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanti, *N. benthamiana*, *N. megalosiphon*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis sativus*).

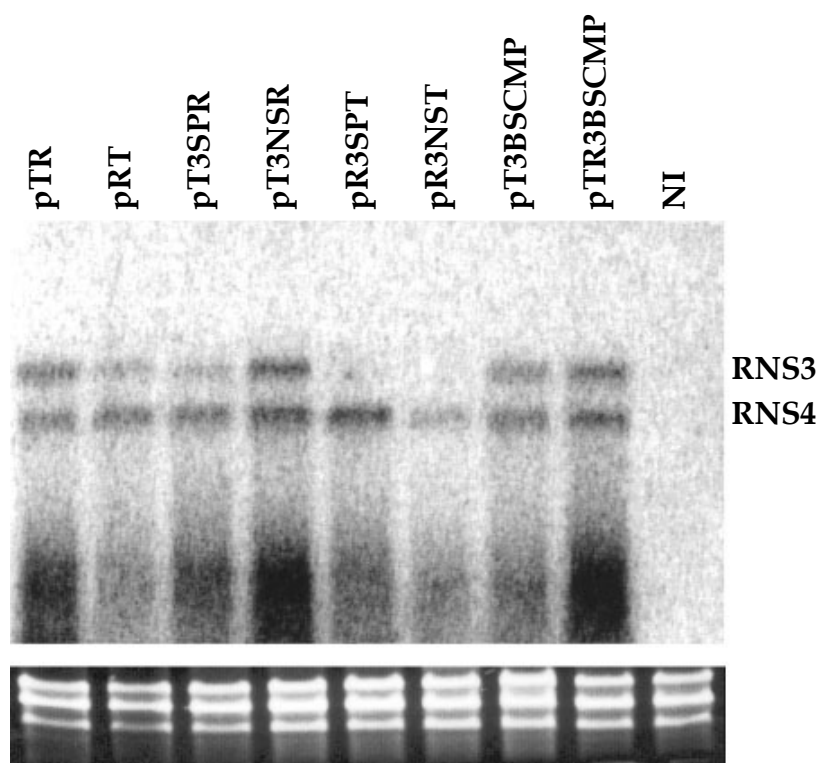
Az előbbiek során beépített restriktációs endonukleáz hasítóhelyek, illetve a korábban közvetlenül a CP elé integrált *NdeI* hasítóhely felhasználásával készítettük el a rekombináns klónokat. A rekombináns MP gén mellé, mely a TAV MP első 250 aminosava után a CMV MP C-terminális 29 aminosavát kódolta beépítettük mind a TAV (pT3BSCMP) mind a CMV (pTR3BSCMP) köpenyfehérjéjét kódoló részt. Rekombináns köpenyfehérjéjét hordozó klónok közül a TAV 69 amino-terminális aminosavát kódoló rész mellé a CMV 150 C-terminális aminosavát kódoló részt építettük, majd ezt mind a TAV (pT3SPR) mind a CMV (pR3NST) MP-vel is kombináltuk. A megfelelő reciprok klónokat is elkészítettük, melyekben a CMV 69 aminosavát a TAV 150 C-terminális aminosava követi a CP-ben, majd ezt mind a TAV (pT3NSR) mind a CMV (pR3SPT) MP-el kombináltuk (18. ábra).



18. ábra Az elkészített szülői és rekombináns RNS3 konstrukciók sematikus ábrázolása.

#### 4. 3. 2. A rekombináns vírusok vizsgálata *Nicotiana clevelandii* protoplaszt rendszerben

A rekombináns klónokról készült *in vitro* transzkriptumok életképességét először *N. clevelandii* protoplaszt rendszerben vizsgáltuk R-CMV RNS1 és 2 transzkriptum jelenjében. Megállapítottuk, hogy az RNS3 rekombinánsok hatékonyan replikálódtak, bár a pR3SPT-t és a pR3NST replikációja a többi konstrukcióhoz képest kevésbé volt hatékony. A szubgenomi RNS4 mindegyik esetben hasonló mennyiségben keletkezett (19. ábra).



**19. ábra** A különböző rekombinánsokkal fertőzött *N. clevelandii* protoplasztok Northern blott analízise. A radioaktív próba a CMV és TAV köpenyfehérjékre volt specifikus. Az etídium bromiddal festett rRNS kontroll, az ábrán alsó részén kerül bemutatásra.

#### 4. 3. 3. A rekombináns MP-t hordozó vírusok vizsgálata növényeken

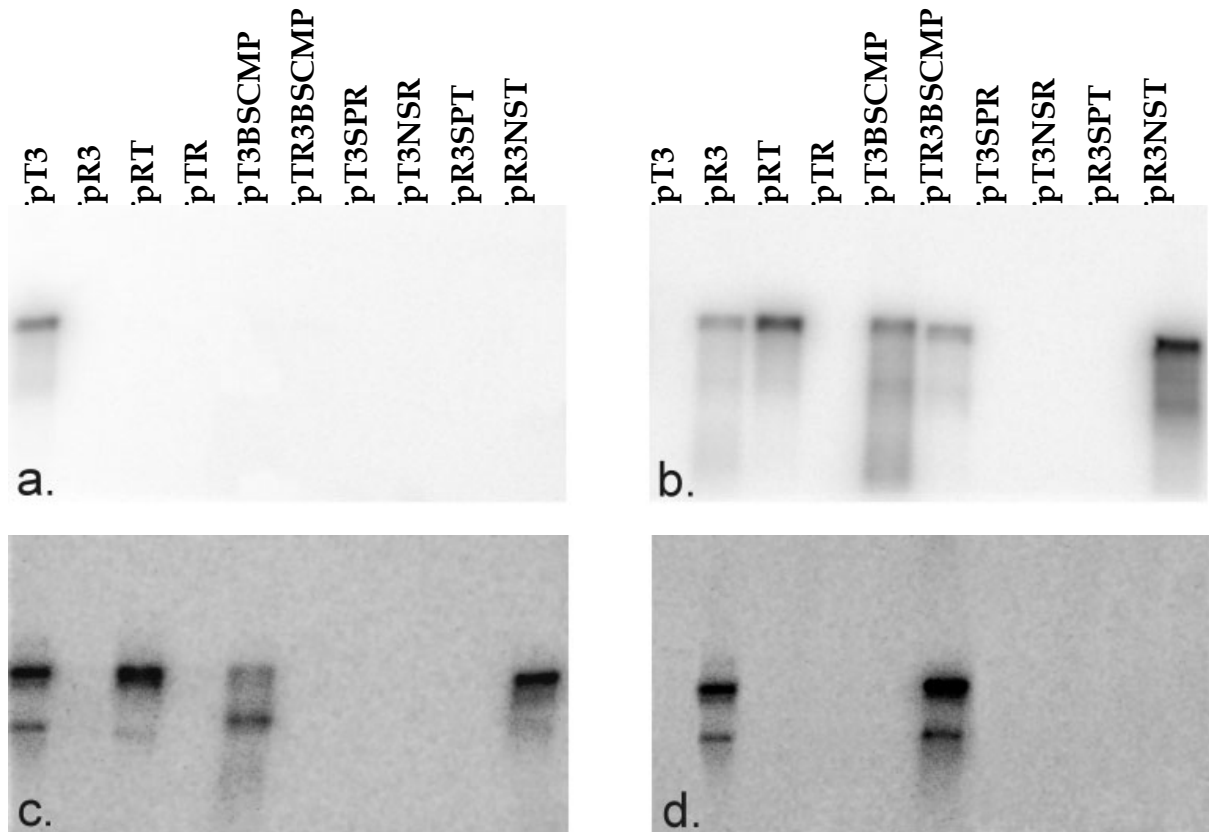
A CMV és TAV számos közös, szisztemikus gazdanövényét (*N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *C. quinoa* és *C. amaranticolor*) inokuláltuk a rekombináns klónokról készült transzkriptumokkal, R-CMV RNS1 és 2 transzkriptumok jelenlétében. Minden fertőzési kísérletet legalább három alkalommal elvégeztünk, 3-3 növény felhasználásával.

A TAV MP 30, karboxi-terminális aminosavát a CMV homológ, 29 aminosav hosszúságú részére cserélve, az egyébként csak TAV eredetű részeket hordozó rekombináns (T3BSCMP) fertőzőképesnek bizonyult mindegyik tesztnövényen (20. ábra). A megjelenő tünetek ennél a rekombinánsnál enyhébbek voltak (pl. enyhébb mozaik, kisebb léziók) és később is jelentek meg, mint az R1R2T3 kontroll fertőzés esetében. A kísérlet bizonyította, hogy a rekombináns MP működőképes, a rekombináns MT-t hordozó vírus fertőzőképes, bár a rekombináns fehérje szerkezete nem optimális, hiszen a rekombináns vírus a szülőinél kevésbé volt virulens.

Mivel ez a rekombináns MP működőképesnek bizonyult, a tesztnövényeken lokális, illetve szisztemikus tüneteket sem okozó pTR rekombináns MP-jét ezzel a rekombináns MP-vel helyettesítettük (pTR3BSCMP). A fertőzési kísérletek során szisztemikus tüneteket (*N. clevelandii*, *N. benthamiana*) illetve lokális tüneteket (*C. quinoa* és *C. amaranticolor*) okozott ez a rekombináns vírus, bár a tünetek az eredeti R1R1T3 vírusénál ebben az esetben is később alakultak ki. Megállapítottuk, hogy a növényeken még lokális tüneteket sem okozó TR3 rekombináns vírus fertőzőképessége helyreállítható a MP karboxi-terminális 29/30 aminosavának CMV eredetűre történő cseréjével, tehát ez a régió felelős azért, hogy a MP milyen köpenyfehérjével rendelkező vírusok sejtről-sejtre terjedését képes biztosítani.

Következő kísérletünk során a CP-n belül lokalizáltuk azt a régiót, mely a MP specifikus sejtről-sejtre terjedésben szerepet játszik. Ehhez először a különböző rekombináns köpenyfehérjéket a CMV illetve TAV MP jelenlétében vizsgáltuk, (pR3NST, pR3SPT, pT3NSR, pT3SPR). Míg protoplaszt rendszerben mind a négy konstrukció hatékonyan replikálódott (19. ábra), addig különböző gazdanövények

fertőzése során csak a pR3NST konstrukcióval történő inokulálás során alakultak ki szisztemikus tünetek. Tünettani megfigyeléseinket a Northern analízis eredménye is alátámasztotta (20. ábra). Csak a pR3NST konstrukcióval fertőzött növényekben tudtuk kimutatni vírus jelenlétét, a pR3SPT, a pT3NSR és a pT3SPR konstrukcióval fertőzött növények esetén nem. Mivel az a konstrukció, mely a CMV N-terminális régiója mellett a TAV C-terminális régióját hordozta sem a CMV sem a TAV MP-vel nem volt fertőzőképes, feltételeztük, hogy a rekombináns CP készítése során a CP valamelyik funkcionálisan fontos régióját átalakítottuk, így a CP valamely funkciója nem működött. Ezért következő lépésben az eredeti, és a rekombináns fehérjék szerkezetét vizsgáltuk meg.



**20. ábra.** *N. cleavelandii* növények fertőzött leveleinek Northern blott analízise. A radioaktív próba specifikus volt a TAV MP kódoló régió 3' végi 90 nt-jára (a), a CMV MP kódoló régió 3' végi 90 nt-jára (b), a TAV CP kódoló régió 5' 210 nt-jára (c) illetve a CMV CP kódoló régió 5' 210 nt-jára (d).

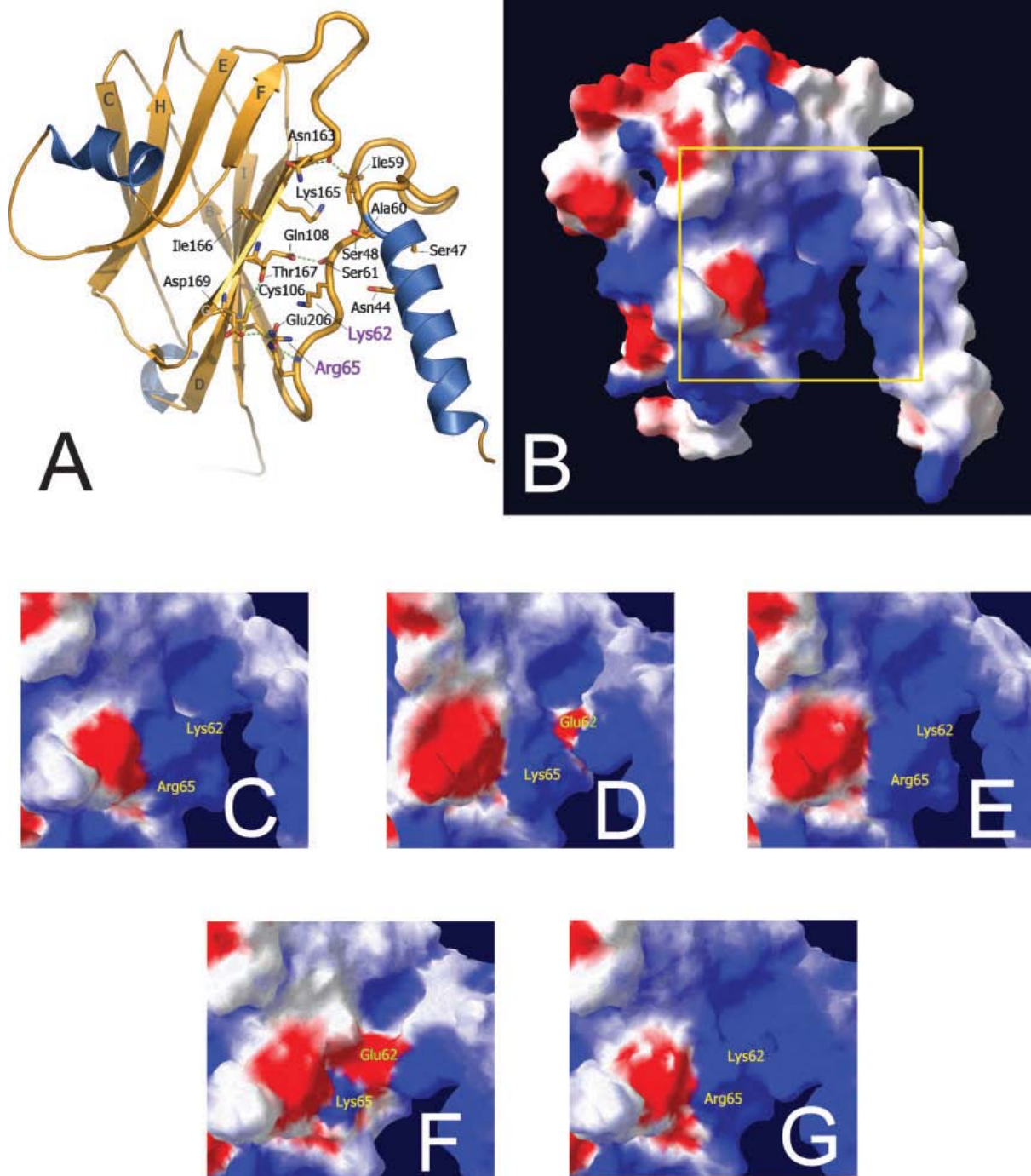
#### 4. 3. 4. Köpenyfehérje szerkezeti vizsgálatok

A homológia modellezés megkezdésekor még csak az Fny-CMV röntgendiffrakciós szerkezete volt ismert (Smith és mtsai., 2000), így először a P-TAV CP modell szerkezetét készítettük el, majd az Fny-CMV és a P-TAV modell szerkezeteit felhasználva a rekombináns CP-k modell szerkezetét is elkészítettük. A sejtről-sejtre történő mozgásában sérült konstrukciók köpenyfehérje szerkezete (pR3SPT CP, pT3NSR CP) és a hatékonyan mozgó szülői (pT3, pR3) és rekombináns (pR3NST CP CP) köpenyfehérjék szerkezete között szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni, ezért a köpenyfehérje felszín elektrosztatikus tulajdonságait részletesebben vizsgáltuk.

A vizsgálatok során azonosítottunk két „zsebet” az első N-terminális  $\alpha$  hélix régiót követő részen (21. ábra), mely mindegyik CP szerkezeten megtalálható. Ebben a régióban sikerült különbséget megfigyelni a fertőzőképes és a nem fertőző konstrukciók között. Míg a sejtről-sejtre hatékonyan terjedő konstrukciók esetén (P-TAV, R-CMV, R3NST) a 62. aminosav körüli fehérjerész elsősorban pozitív töltésű (21. C, D, E ábra), addig a mozgásában gátolt konstrukció (R3SPT) esetében ez a régió inkább negatív töltésű (21. F ábra). Ennek a negatív töltésnek a megjelenése a 62. aminosav pozíciójű Glu és a 65. aminosav pozíciójű Lys eltérő aminosav környezetének és eltérő pozíciójának következménye. A töltésviszonyok alapján feltételeztük, hogy a pR3SPT konstrukció elektrosztatikus viszonyai miatt nem tudott megfelelő kölcsönhatást kialakítani más vírus vagy növényi eredetű fehérjékkel. A töltési viszonyok megváltoztatására a pR3SPT konstrukcióban egy kétszeresen mutáns köpenyfehérjét terveztünk, mely a 62. aminosav pozícióban lizint, a 65. aminosav pozícióban pedig arginint tartalmazott. A mutáns modellszerkezet töltésviszonyai (21. G ábra) már lényegesen nem tértek el a jól szisztemizálódó vírusokétól.

A tervezett mutációkat a pR3SPT és a pT3NSR konstrukcióba építettük PCR irányított mutagenézissel.

dc\_341\_11

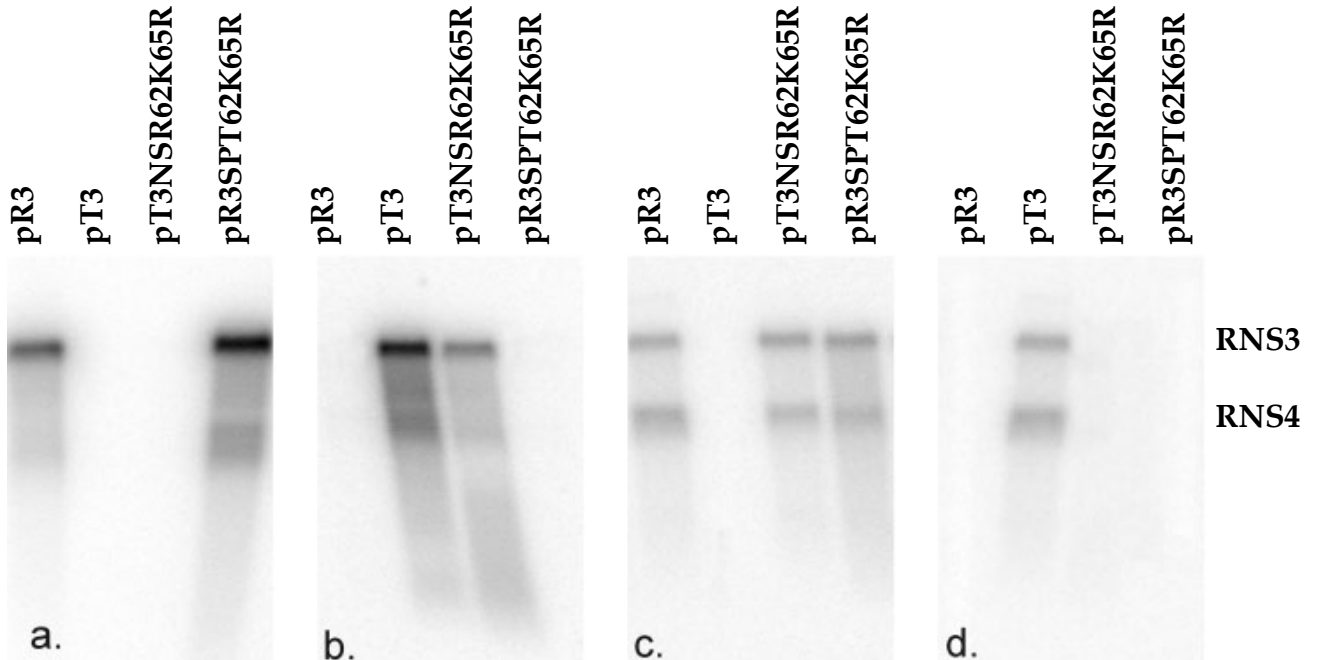


**21. ábra** A köpenyfehérje szerkezet analízise. **A:** a TAV CP B alegységének szalagmodellje. **B:** a TAV CP B alegység felszínének elektrosztatikus viszonyai. A sárgával bekeretezett részt a különböző konstrukciók esetén részletesen vizsgáltuk **C:** P-TAV CP, **D:** R-CMV CP, **E:** R3NST CP, **F:** R3SPT CP, **G:** R3SPT62K65R CP. A piros részek minden esetben a  $-1,8$  kT-nél kisebb; a fehér a  $0,0$ ; míg a kék az  $1,8$  kT-nél nagyobb potenciál értékeket jelöli.

Az így készített konstrukciók (pT3NSR62K65R, pR3SPT62K65R) nukleinsav sorrendjét ellenőriztük, majd R-CMV RNS1 és 2 transzkriptumok jelenlétében különböző tesztnövényeket inokuláltunk. *Chenopodium quinoa* és *Chenopodium amaranticolor* növényeken 5-7 nappal a fertőzés után lokális léziók, míg a szisztémikus gazdanövényeken (*N. tabacum* cv. Xanthi, *N. clevelandii*) 7-10 nappal a fertőzés után a cucumovírusokra jellemző szisztémikus tüneteket figyeltünk meg. A Northern analízis (22. ábra), illetve az RT/PCRreakciót követő nukleinsav sorrend analízis bizonyította, hogy a mutáns rekombináns vírusok szisztemizálódtak, és nukleinsav sorrendjük nem változott.

Tehát a sejtről-sejtre terjedésben gátolt pTR klón fertőzőképessége helyreállt, amikor a köpenyfehéjre karboxi-terminális 2/3 részét TAV eredetűre cseréltük.

Összegezve a MP és a CP rekombináns vírusokkal végzett kísérleteinket elmondhatjuk, hogy a MP C-terminális 29/30-as-ának és a CP karboxi-terminális 2/3-ának kompatibilitása szükséges a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez.



**22. ábra** *N. clevelandii* növények fertőzött leveleinek Northern blott analízise. A radioaktív próba specifikus volt a CMV MP kódoló régió 3' végi 90 nt-jára (a), a TAV MP kódoló régió 3' végi 90 nt-jára (b), a CMV CP kódoló régió 5' 210 nt-jára (c) illetve a TAV CP kódoló régió 5' 210 nt-jára (d).



#### 4. 4. Heterológ mozgási fehérje jelentősen módosíthatja a CMV-re jellemző tüneteket

Az előző fejezetekben bemutattam, hogy a vírustünetek változatosságáért egyetlen vírusfehérje egyetlen aminosava is felelős lehet, illetve, hogy a vírus növényen belüli terjedéséhez, az egész növény megbetegítéséhez a különböző vírusfehérjék összehangolt működése szükséges. Ugyanakkor felmerült bennünk a kérdés, hogy különböző víruscsaládokhoz tartozó vírusok hasonló funkciójú fehérjei képesek-e egymást helyettesíteni, valamint, hogy ez milyen hatással lehet a tünetek kialakítására. Ennek a célnak megfelelően a *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéjével (ORF4) helyettesítettük a Trk7-CMV mozgási fehérjéjét, majd a vírus terjedését, illetve a vírustünetek változását vizsgáltuk.

##### 4. 4. 1. A *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus mozgási fehérjéjét hordozó rekombináns vírus készítése, a rekombináns vírus fertőzőképességének vizsgálata

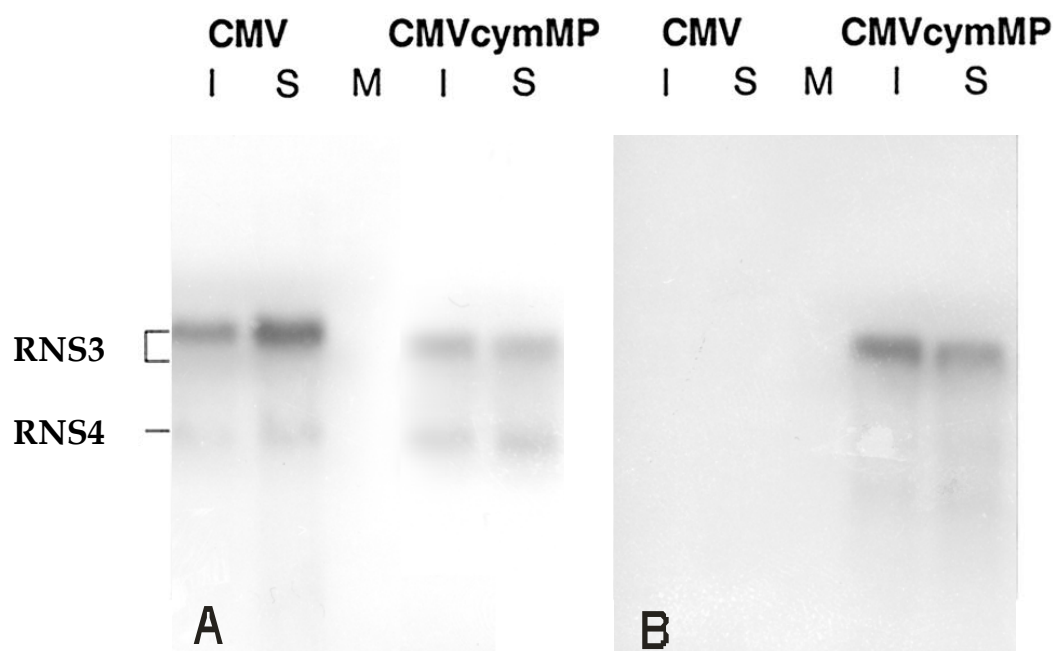
A Trk7-CMV RNS3 klónjából a teljes 3a mozgási fehérjét eltávolítottuk, és helyére a CymRSV mutáns mozgási fehérjéjét klónoztuk, mely nem tartalmazta az egyébként ezzel a régióval átfedve kódolódó p19 fehérjét (23. ábra).



23. ábra A CymRSV mozgási fehérjét hordozó rekombináns vírus genomszerveződésének sematikus ábrázolása. Sárgával a CymRSV-ből származó genomszakaszt emeltük ki.

Az így elkészített klónról készült transzkriptummal (pCMV3cymMP) a Trk7-CMV RNS1 és 2 transzkriptumok jelenlétében különböző tesztnövényeket inokuláltunk. A *Chenopodium quinoa* és *Chenopodium amaranticolor* növényeken az

inokulálást követően 3-5 nappal lokális léziókat figyeltünk meg, míg *Nicotiana benthamiana* és *Nicotiana clevelandii* növényeken 5-7 nappal az inokulálás után szisztemikus tüneteket jelentek meg. A szisztemikusan fertőzött levelek Northern analízise is megerősítette a vizuális megfigyeléseket (24. ábra). Míg a CMV CP specifikus próbával mind a CMV3cymMP fertőzött növény, mind a kontrol CMV fertőzés kimutatható volt, addig a CymMP próba esetén csak a rekombináns vírusnál kaptunk jelet.



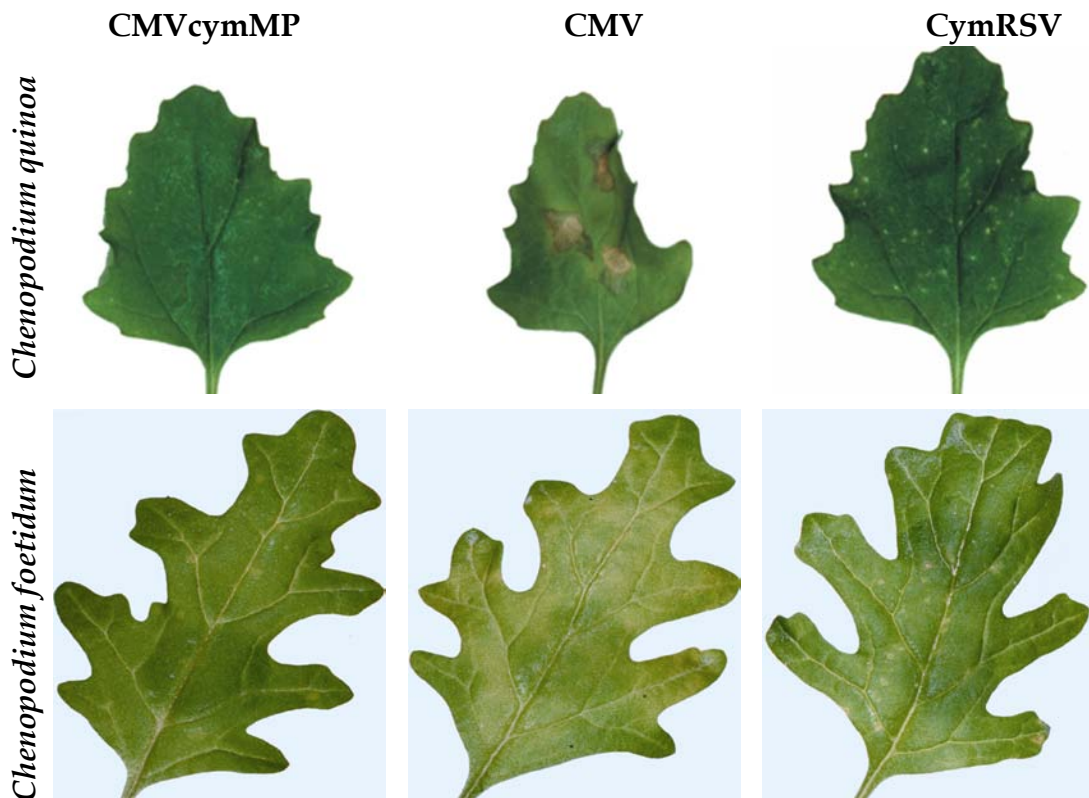
**24. ábra** CMV és CMVcymMP vírus RNS akkumuláció *N. benthamiana* növényben. A növényi RNS mintákat az inokulált (I) illetve szisztemikusan (S) fertőzött levelekből 7 illetve 14 nappal a fertőzés után vontuk ki. A radioaktívan jelölt próbák a CMV 3-as RNS-re (A) illetve a CymRSV MP génre (B) specifikusak.

A rekombináns vírust a CMV-nél használt protokoll szerint tisztítottuk. A vírustisztítás hatékonysága nem tért el a CMV esetén megszokottól, és a víruspartikulum elektronmikroszkópos képe sem mutatott eltérést (nincs bemutatva). A tisztított, rekombináns vírust RT/PCR-t követő nukleinsav sorrend meghatározással is ellenőriztük és megállapítottuk, hogy a konstrukció stabil volt.

#### 4. 4. 2. A rekombináns vírus tünettani jellemzése

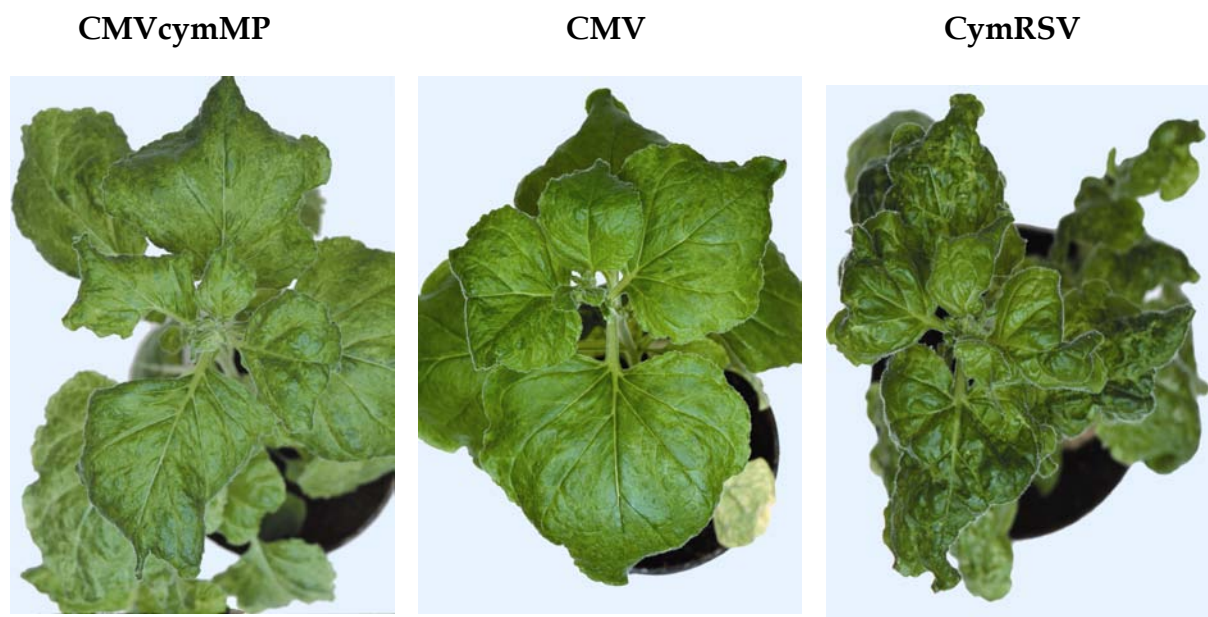
A további fertőzési kísérletekhez minden esetben tisztított viriont használtunk, 50 mg/ml koncentrációban. A fertőzéseket kilenc növényfajon végeztük el a szülői, illetve a rekombináns vírusok felhasználásával. A tesztnövényeket három csoportba soroltuk aszerint, hogy mindkét szülői vírus lokális fertőzést okoz (1. csoport), mindkét szülői vírus szisztemikus tüneteket indukál (2. csoport) vagy csak az egyik vírus alakít ki szisztemikus tüneteket (3. csoport).

Az első csoportba különböző *Chenopodium* fajok tartoztak. Ezeket a növényeket, a szülői vírusokhoz hasonló módon, csak lokálisan fertőzte a hibrid vírus. A megjelenő léziók mérete és jellege inkább a CymRSV-re hasonlított (25. ábra). Míg például *Chenopodium quinoa* tesztnövényen a CMV nekrotikus, folyton növekvő léziót indukál, addig a CymRSV és a rekombináns CMVcymMP klorotikus, apró léziókat alakít ki. *Chenopodium foetidum* növényeken a CMV nagyobb, diffúzabb léziókat, míg a CymRSV és a CMVcymMP apró klorotikus léziókat indukál.



25. ábra A rekombináns és a szülői vírusok okozta lokális tünetek *Chenopodium* fajokon.

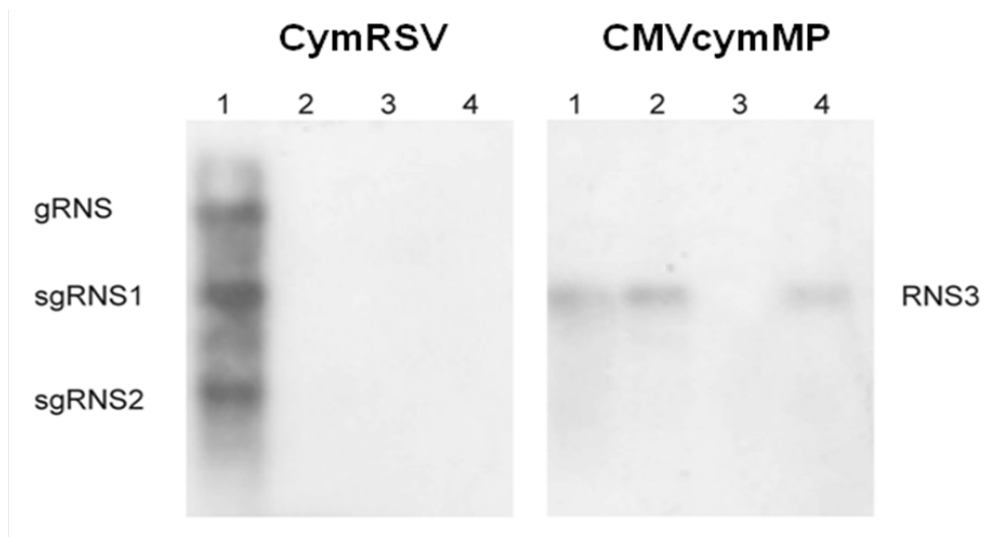
A vizsgált növények második csoportjába tartozó növényeknél (*N. benthamiana*, *N. clevelandii* és *N. megalosiphon*) a hibrid vírus a szülői vírusokhoz hasonlóan szisztematikus fertőzést okoz. A CMVcymMP vírus tünetei mindkét szülői vírus tüneteire emlékeztettek, levéldeformációt és mozaik tüneteket figyeltünk meg. A szülői vírusoknál a tünetek erőssége eltérő. A hibrid vírus a CymRSV-nél gyengébb, a CMV-nél pedig erősebb tüneteket indukált. Példaként a *Nicotiana benthamiana* növényeken okozott tüneteket mutatom be (26. ábra).



**26. ábra** A CMVcymMP, CMV és CymRSV vírusok által okozott tünetek *N. benthamiana* növényeken 14 nappal az inokulálás után.

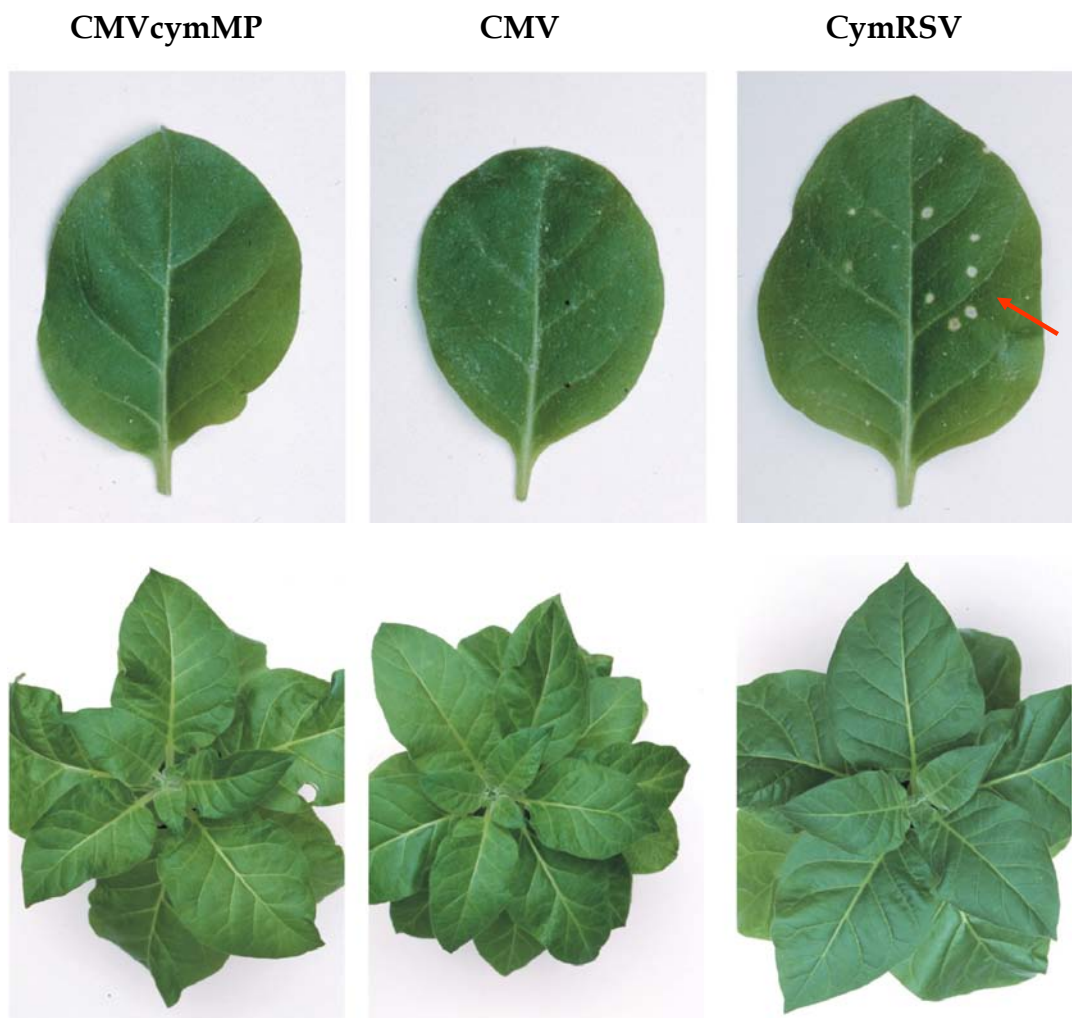
A vizsgált teszt növények harmadik csoportjába tartozó *N. debney*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi növényeken a szülői vírusok közül a CymRSV nem okoz szisztemikus tüneteket, a vírus a nem inokulált, csúcsi levelekből nem mutatható ki, míg a CMV mindhárom gazdanövényen szisztemikus tüneteket indukál. A rekombináns CMVcymMP vírus szisztemikusan fertőzi a *N. debney* és *N. tabacum* cv. Xanthi növényeket, azonban a *N. glutinosa* növényen csak lokális fertőzést indukál (27. ábra).

dc\_341\_11



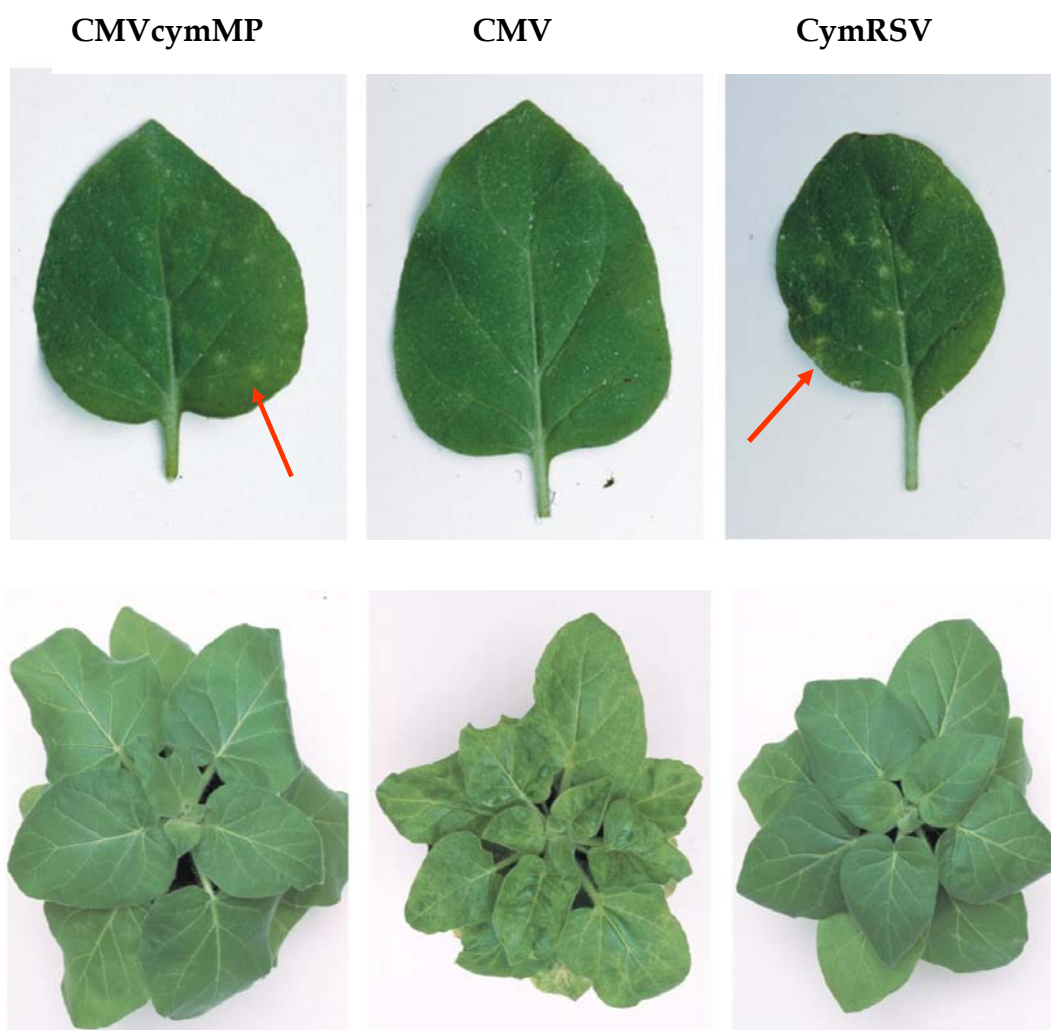
**27. ábra** CymRSV és CMVcymMP vírus RNS akkumulációja különböző tesztnövényeken 14 nappal az inokulálás után. A tesztnövények a következők: *N. megalosiphon* (1), *N. tabacum* cv. Xanthi (2), *N. glutinosa* (3), *N. debney* (4). A radioaktívan jelölt próba a CymRSV MP génre specifikus. (gRNS a CymRSV genomikus RNS-e, sgRNS1, sgRNS2 a CymRSV subgenomikus RNS-ei.)

A CMVcymMP a *N. debneyi* és *N. tabacum* cv. Xanthi tesztnövényeket szisztemikusan fertőzte és a tünetek is kialakultak a nem inokulált leveleken. Példaként a *N. tabacum* cv. Xanthi növényeken indukált tüneteket mutatom be (28. ábra). A CymRSV esetében jól megfigyelhetők voltak a fertőzött leveleken kialakuló lokális léziók, amik sem a CMV, sem a hibrid vírus hatására nem alakulnak ki. A hibrid vírusnál megjelenő szisztemikus tünetek ebben az esetben a CMV által indukált tünetekre emlékeztettek.



**28. ábra** A CMVcymMP, CMV és CymRSV vírusok által okozott tünetek *N. tabacum* cv. Xanthi növényeken. Az inokulált leveleket 7 nappal, a teljes növényt 21 nappal a fertőzés után fényképeztük. (A piros nyíl a lokális léziókat mutatja.)

A *Nicotiana glutinosa* tesztnövényen a hybrid vírus a CymRSV-hez hasonlóan lokális léziókat indukált a fertőzött leveleken, bár a léziók a CMVcymMP esetén diffúzabbak és halványabbak voltak a szülői vírushoz képest. A szisztemikus terjedésre ezen a gazdanövényen a CMVcymRSV nem volt képes (29. ábra).



**29. ábra** A CMVcymMP, CMV és CymRSV vírusok által okozott tünetek *N. glutinosa* növényeken. Az inokulált leveleket 7 nappal, a teljes növényt 21 nappal a az inokulálás után után fényképeztük. (A piros nyilak a lokális léziókat mutatják.)

Tehát összefoglalva elmondhatjuk, hogy egy heterológ mozgási fehérjének hatása van a tünetek kialakulására. A vizsgált gazdanövények I. csoportja (*Chenopodium spp.*) esetében meghatározza a lokális léziók méretét, jellegét. A II.

csoportha tartozó *Nicotiana* fajoknál módosítja a vírushatás tüneteit, míg a III. csoportba tartozó *Nicotiana glutinosa* növényen lokális léziót indukál de szisztemikus tünetek nem alakulnak ki. A másik két, ebbe a csoportba tartozó gazdanövényen szisztemikus tünetek alakultak ki.

#### **4. 5. A Pannon ökorégióban előforduló PSV izolátumok jellemzése**

Mint az előző munkák során bemutattam, a cucumovírusok hármas RNS-én kódoló géneknek fontos szerepe van mind a jellemző tünetek kialakításában, mind a gazdanövénykör meghatározásában. A szintén Cucumovirus nemzetségbe tartozó, de elsősorban pillangósokon előforduló földimogyoró törpülés vírusról (*Peanut stunt virus, PSV*) sokkal kevesebb információ érhető el e tekintetben, különösen az akác növényekről származó izolátumok esetén. Éppen ezért tűztük ki célul akácról származó PSV izolátumok gyűjtését, tünettani és molekuláris biológiai jellemzését. Így egy gödöllői akácról származó izolátummal, az Rp-PSV-vel kezdtünk el foglalkozni.

##### **4. 5. 1. Az Rp-PSV nukleotid sorrendjének meghatározása, filogenetikai és rekombinációs elemzése**

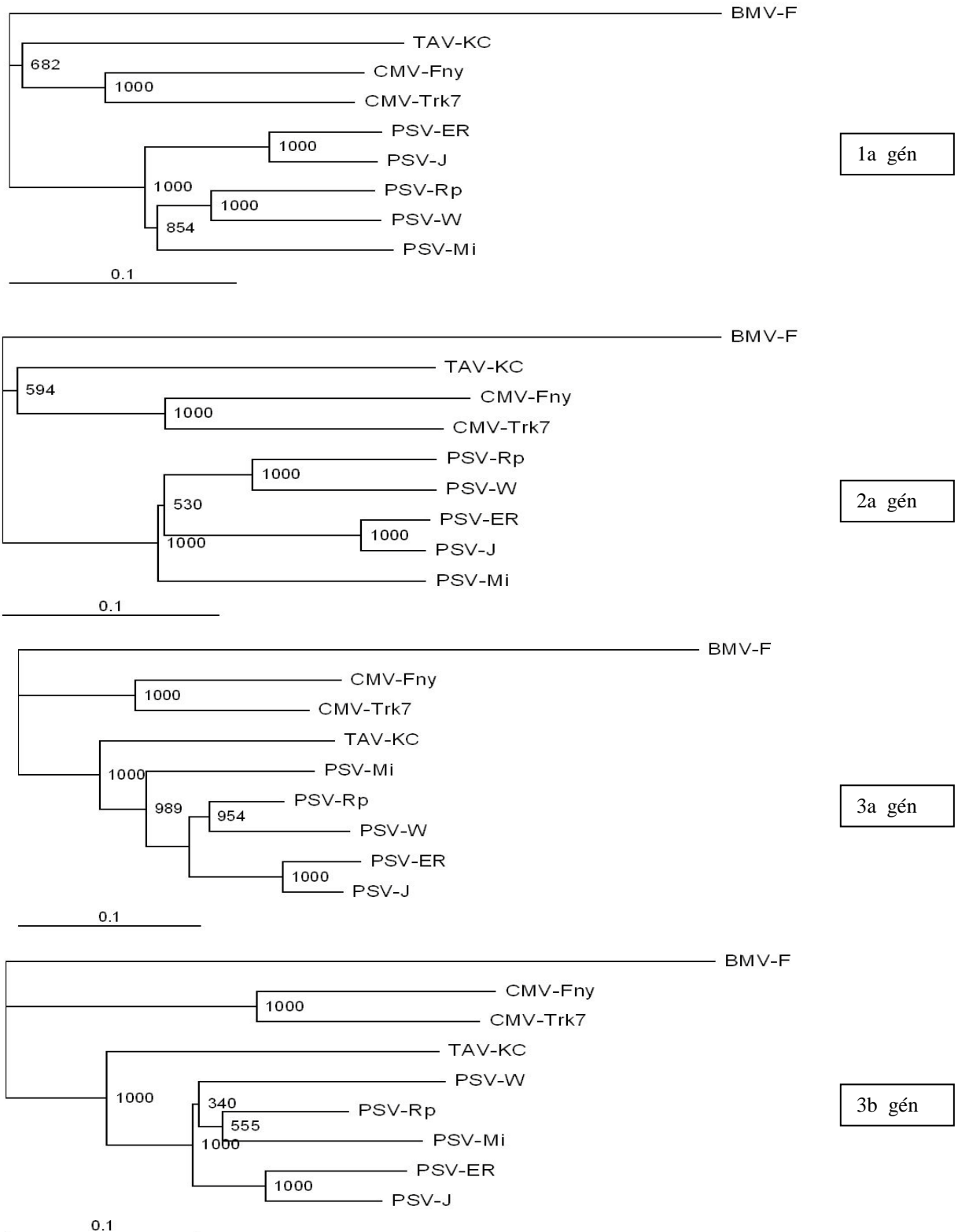
Az Rp-PSV izolátumot tesztnövényen történő felszaporítás után tisztítottuk, majd vírus RNS-t vontunk ki. Mivel az adatbankban ismert PSV szekvenciákkal homológ oligonukleotidokkal nem sikerült a vírus RNS amplifikációja, az RNS-ek 3' végét poliadenilálás után klónoztuk, és meghatároztuk a valós 3' vég nukleinsav sorrendjét, majd a mindhárom RNS valós 5' vég nukleinsav sorrendjét is meghatároztuk. A meghatározott nukleinsav sorrend ismeretében specifikus oligonukleotidokat rendeltünk, majd mindhárom genomi RNS-t klónoztuk és meghatároztuk a teljes nukleinsav sorrendjüket. A genomi RNS-ek nukleinsav sorrendjét elhelyeztük a GenBank nemzetközi adatbázisban az AM905353, AM905354, AM905355 azonosító számok alatt. Az RNS1 3325 nt, az RNS2 2942 nt, az RNS3 2208 nt hosszúságúnak bizonyult, mely adatok megközelítőleg megegyeztek az adatbankban található más PSV izolátumok nukleinsav



sorrendjének hosszával, és a cucumovírusokra jellemző öt nyílt leolvasási keret is azonosítható volt.

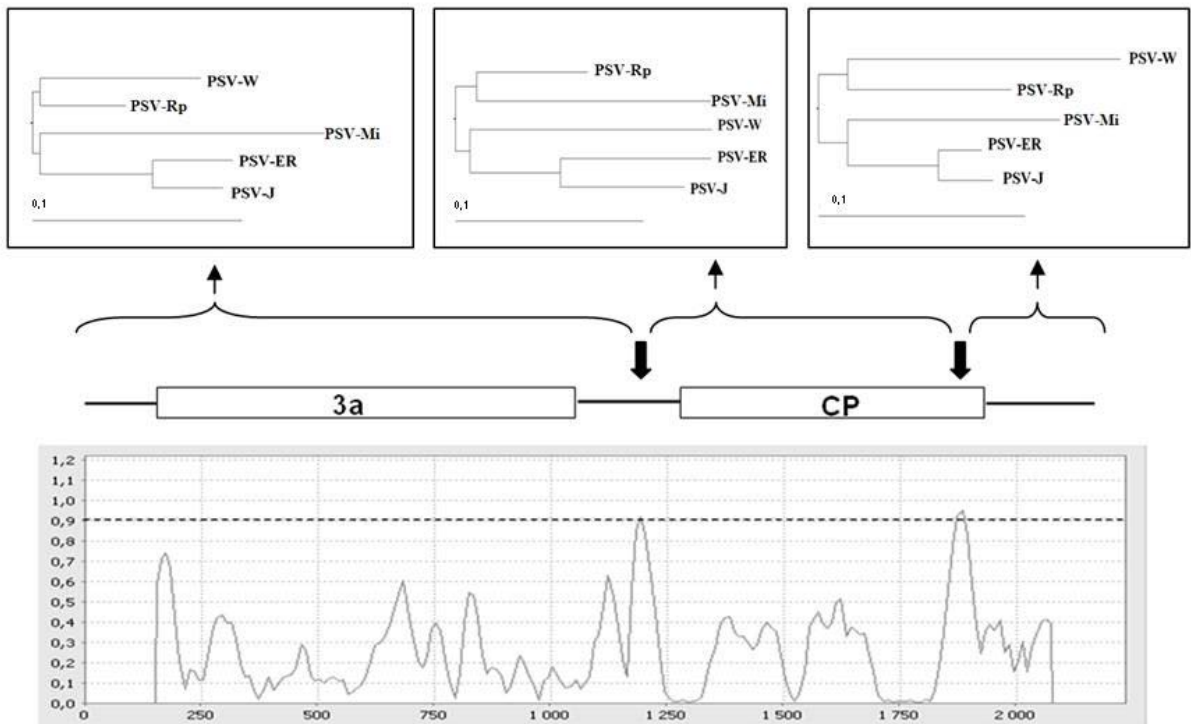
Az általunk meghatározott nukleinsav sorrendeket összehasonlítottuk az adatbankban megtalálható PSV, illetve más cucumovírus szekvenciákkal. Megállapítottuk, hogy az Rp-PSV nukleinsav szinten az RNS1 és 2 esetében a W-PSV-vel (84,6 %), a teljes RNS3 esetén pedig a J-PSV-el (83,9 %) mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A géneket kódoló szakaszainak homológia viszonyait külön-külön vizsgálva, az 1a, 2a fehérjét, illetve a 3a fehérjét kódoló szakaszok továbbra is a W-PSV-vel mutatták a legnagyobb hasonlóságot, azonban a CP-t kódoló gén esetén a Mi-PSV-vel kaptuk a legnagyobb hasonlóságot. A géneket kódoló szakaszok filogenetikai analízisét is elvégeztük, ami teljesen egybeesett a homológia vizsgálatokkal (30. ábra). Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy az általunk vizsgált Rp-PSV izolátum semelyik korábban leírt PSV alcsoportba sem illeszthető, hiszen a nukleinsav sorrendek azonossága minden esetben elmaradt a megkívánt 90 %-os értéktől.

# dc\_341\_11



**30. ábra** A Cucumovirus nemzetség 1a, 2a, 3a és 3b génjeinek nukleotid alapú filogenetikai vizsgálata. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják, a BMV-F (GenBank DQ530423, DQ530424, DQ530425) csoporton kívüli kontroll izolátum.

Mivel az RNS3-on kódolódó két gén a filogenetikai vizsgálat során eltérő rokonsági viszonyokat mutatott, az RNS3-at rekombinációs analízisnek vetettük alá. A rekombinációs vizsgálatokban a GenBank-ban elérhető teljes PSV RNS3 nukleinsav sorrendeket vontuk be. Az elemzés során 2 feltételezett rekombinációs forró pontot azonosítottunk 95 %-os szignifikancia szinten az 1199 nt és az 1873 nt körüli régióban. (a nt értékeket az Rp-PSV nukleotid sorrendjéhez viszonyítva adtuk meg). Az első forró pont a két kódoló szakasz közötti régióban található, míg a második a CP génben, 47 nt-dal a stop kodon előtt helyezkedik el. Így a két rekombinációs pont három szakaszra osztja az RNS3-t. Ezekre a szakaszokra újból elvégeztük a filogenetikai elemzést (31. ábra).



**31. ábra.** A PSV RNS3 rekombinációs és filogenetikai elemzése. Az ábra alján a TOPALI v2 programcsomag PDM analízisével meghatározott rekombinációs pontok lokalizációja látható (ablakok mérete: 200 nt, lépések mérete: 10 nt). A szaggatott vonalak a 95 %-os szignifikancia szintet jelölik. Felette a PSV RNS3 molekula sematikus ábrázolása található. A két vastag nyíl a rekombinációs pontok helyét jelöli, a kapcsos zárójelek és a nyilak az adott régiókból készült törzsfát jelölik.

Az első forró pont előtti, és a második forró pont utáni régiók esetén az Rp-PSV a W-PSV-vel mutatta a legközelebbi rokonságot, míg a közbeeső szakasz a Mi-PSV-vel volt a legszorosabb kapcsolatban.

A filogenetikai eredmények alapján egyértelműen állíthatjuk, hogy a PSV evolúciója során RNS3 szinten rekombinációs esemény játszódott le. Az alacsony azonossági értékek arra utalnak, hogy ez a rekombináció régen történhetett.

#### **4. 5. 2. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok jellemzése**

Az Rp-PSV jellemzése során felvetődött a kérdés, hogy ez az izolátum teljesen egyedi-e, illetve akácfaikon milyen PSV izolátumok fordulnak elő régióinkban. A további vizsgálatokhoz 9 PSV izolátumot gyűjtöttünk akác növényekről Budapestről (B-PSV), Mezőcsátról (Cs-PSV), Füzesgyarmatról (F-PSV), Ljubljánából, Szlovéniából (Ljb-PSV), Gödöllőről (Rp2), Szeghalomról (Sz-PSV), Tihanyból (T1-PSV, T2-PSV) és Tevelről (Tev-PSV). Egyléziós passzálást követően *N. benthamiana* tesztnövényen tartottuk fenn és szaporítottuk további vírustisztításhoz az izolátumokat.

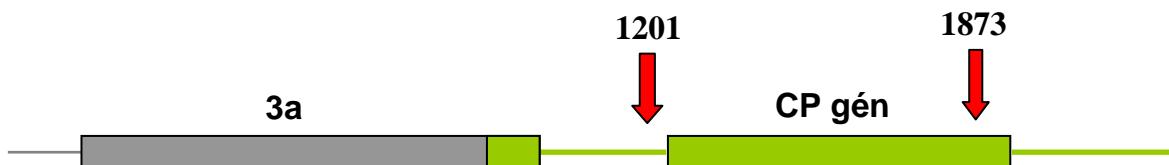
##### **4. 5. 2. 1. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok nukleotid sorrendjének jellemzése és filogenetikai vizsgálata**

Az izolátumok filogenetikai jellemzéséhez az RNS3 részleges klónozását végeztük el. A klónozott darab mindegyik esetben tartalmazta a 3a fehérje kódoló régiójának egy részét, a két gén közötti teljes szakaszt, a teljes CP kódoló régiót és a 3' nem kódoló részt. A meghatározott szakaszok hosszát és GenBank-i azonosító számát a 3. táblázat mutatja. A meghatározott RNS3 szakaszok a legtöbb esetben közel azonos hosszúságúak voltak (1342-1351 nt), variációk a nem kódoló régiókban fordultak elő. A Cs-PSV izolátum esetén lényegesen hosszabb volt a meghatározott rész (1542 nt), ami a 3' nem kódoló rész egy 196 nt hosszú szakaszának duplikációjának a következménye.

**3. táblázat.** A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok meghatározott régióinak hossza és GenBank-i azonosító számai.

| Izolátum neve  | genomi rész    | mérete (nt) | GenBank azonosító szám |
|----------------|----------------|-------------|------------------------|
| <b>PSV-B</b>   | részleges RNS3 | 1342        | FM992670               |
| <b>PSV-Cs</b>  | részleges RNS3 | 1542        | FM992665               |
| <b>PSV-F</b>   | részleges RNS3 | 1346        | FM992666               |
| <b>PSV-Ljb</b> | részleges RNS3 | 1346        | FM992667               |
| <b>PSV-Rp2</b> | részleges RNS3 | 1347        | AM980675               |
| <b>PSV-Sz</b>  | részleges RNS3 | 1345        | FM992671               |
| <b>PSV-T1</b>  | részleges RNS3 | 1345        | FM992669               |
| <b>PSV-T2</b>  | részleges RNS3 | 1351        | FM992668               |
| <b>PSV-Tev</b> | részleges RNS3 | 1349        | FM992672               |

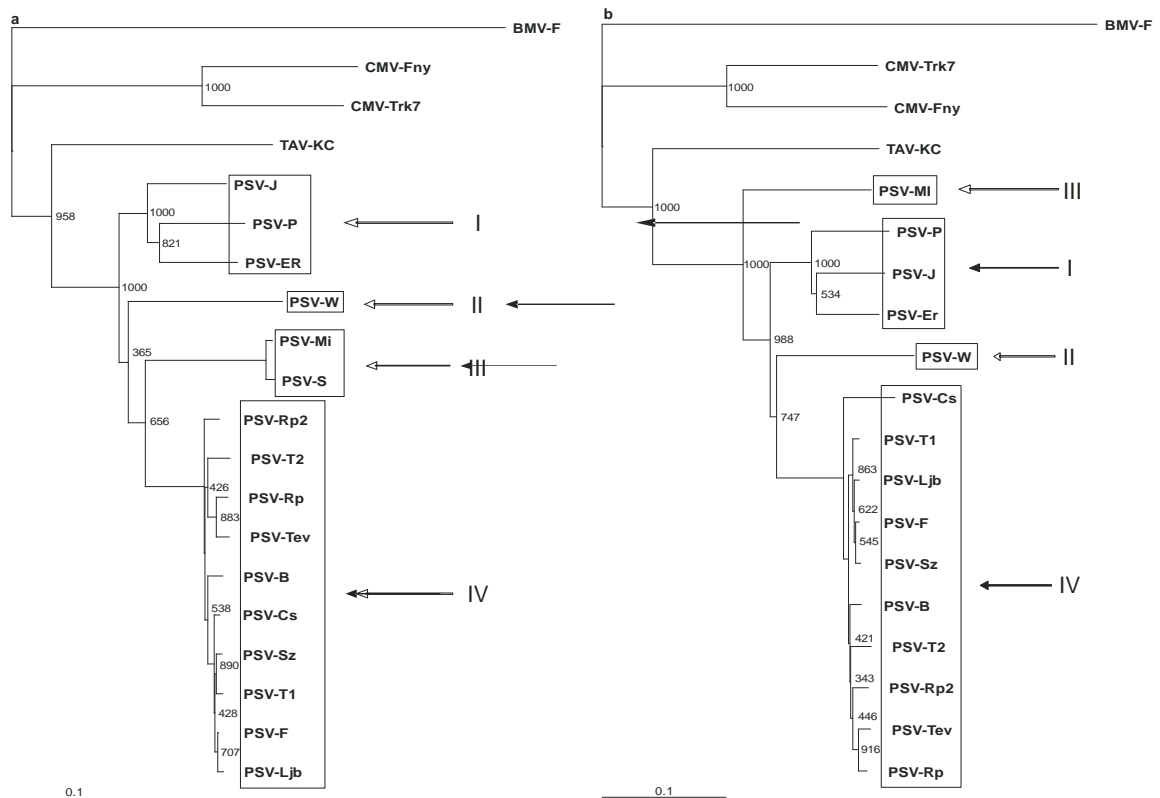
A vizsgált RNS3 szakaszok teljes egészében magukba foglalták azt a régiót is, mely az Rp-PSV esetében a két rekombinációs pontot és a CP gént tartalmazta (32. ábra).



**32. ábra** A PSV RNS3 molekula sematikus ábrázolás. Zöld színnel a Pannon ökorégióból származó izolátumok esetében meghatározott nukleinsav szakasz látható. A piros nyilak az Rp-PSV esetén meghatározott rekombinációs pontok pozícióját jelölik.

A vizsgált újabb kilenc PSV izolátum nuklein és aminosav sorrendjét összehasonlítottuk a korábban vizsgált Rp-PSV izolátuméval, valamint a GenBankban található összes PSV izolátum megfelelő régiójának nukleinsav sorrendjével. A Pannon ökorégióból származó izolátumok nukleotid sorrendje 96,3-98,0 %, míg aminosav sorrendjük 98,1-100 % azonosságot mutatott az Rp-PSV izolátuméval. Egyéb PSV izolátumokkal az azonosság hasonló volt az Rp-PSV-nél leírtakkal. A filogenetikai vizsgálatokat az Rp-PSV-nél meghatározott rekombinációs pontok közé eső régióval, és a teljes klónozott szakasszal is elvégeztük. Az első esetben mindegyik izolátum a Mi-PSV-vel mutatta a legközelebbi rokonságot, míg a teljes szakaszra a W-PSV-vel bizonyult

legszorosabbnak a kapcsolatot. Mindegyik elemzés bizonyította a Pannon ökorégióból származó izolátumok szoros rokonságát, és a többi izolátumtól való határozott elkülönülését (33. ábra). Ezek az akácról származó izolátumok egy új, jól körülhatárolható alcsoportot alkotnak.



**33. ábra** A cucumovírus RNS3 molekulák különböző régiójának filogenetikai vizsgálata. **a:** A rekombinációs pontok közötti nt szakasz, **b:** a részleges MP-t kódoló, a teljes IR, a teljes CP kódoló és a 3' nem kódoló régiókat tartalmazó szakaszok vizsgálata. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményét mutatják. A BMV-F csoporton kívüli kontroll izolátum. A négyzetek és római számok a PSV alcsoportok vizuális elkülönítését és azonosítását segítik.

#### 4. 5. 2. 2. A Pannon ökorégióból származó PSV izolátumok tünettani jellemzése

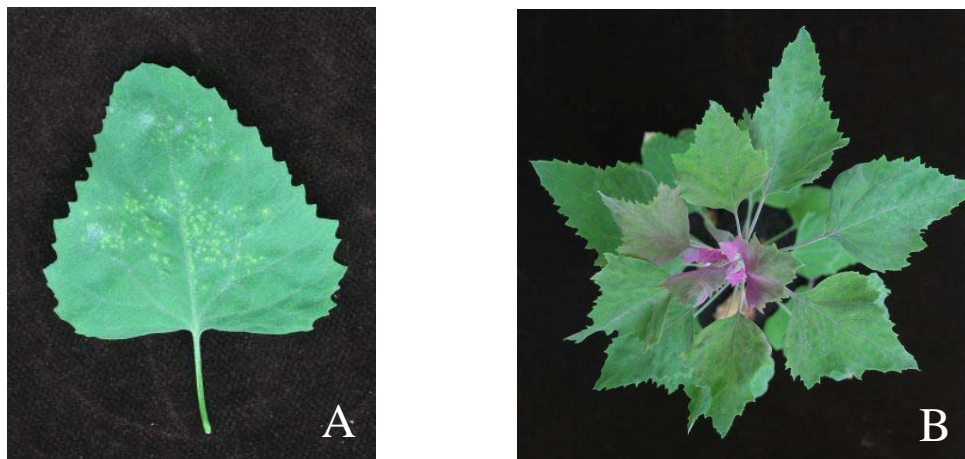
Mivel a vizsgált izolátumok akác növényről származtak, míg az adatbankban található többi PSV izolátumot egyéb pillangós növényekről izolálták, fontosnak tartottuk a legfontosabb tesztnövények tünettani jellemzését is. Összesen 5 növény családba tartozó 16 növényfaj vizsgálatát végeztük el (4. táblázat).

## 4. táblázat A vizsgált PSV izolátumok gazdanövényköre és tünettani jellemzése.

| Növények  | Izolátumok |            |            |            |            |            |            |            |               |            |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|
|   | PSV-B      | PSV-Cs     | PSV-F      | PSV-Ljb    | PSV-Rp     | PSV-Rp2    | PSV-Sz     | PSV-T1     | PSV-T2        | PSV-Tev    |
| <i>Arachis hypogaea</i> L.                                | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu, LR | 0/Mo, Stu  |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste and Reyn.          | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo, Ma    | LLe/Mo, Ma |
| <i>Cucumis sativus</i> L. cv. Delicates                   | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -        | 0/0, -     |
| <i>Lens culinaris</i> Medik. cv. Éva                      | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +        | 0/0, +     |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Keszskeméti jub. | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -        | 0/0, -     |
| <i>Medicago sativa</i> L.                                 | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo          | 0/Mo       |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.                       | 0/Mo, Stu  | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo          | 0/Mo, Stu  |
| <i>N. clevelandii</i> Gray.                               | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo       | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu  | 0/Mo, Stu     | 0/Mo, Stu  |
| <i>N. debney</i> Domin                                    | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -        | 0/0, -     |
| <i>N. glutinosa</i> L.                                    | 0,+/0,-    | 0,+/0,-    | 0,+/Mo, RS | 0,+/Mo, RS | 0,+/0,-    | 0,+/Mo, RS | 0,+/Mo, RS | 0,+/0,-    | 0,+/0,-       | 0,+/0,-    |
| <i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi                           | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -     | 0/0, -        | 0/0, -     |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Babylon                  | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma   | 0/Mo, Ma      | 0/Mo, Ma   |
| <i>Pisum sativum</i> L. cv. Rajnai törpe                  | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +     | 0/0, +        | 0/0, +     |
| <i>Robinia pseudoacacia</i> L.                            | 0/Mo       | LLe/Mo     | 0/Mo       | 0/Mo       | LLe/RS, Mo | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/RS, Mo    | 0/Mo       |
| <i>Vigna sinensis</i> Savi et Hassk. cv. Black eye        | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo     | LLe/Mo, Ma | LLe/Mo        | LLe/Mo     |
| <i>Zinnia elegans</i> Jacq.                               | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo       | 0/Mo          | 0/Mo       |

Az egyes növényeken megjelenő lokális / szisztemikus tünet, 0 = tünet nem látható,  $LL_c$  = klorotikus lokális lézió, LR = levél sodródás, Ma = deformáltság, Mo = tarkulás, mozaik, Stu = satnyulás, törpülés, RS = gyűrűsfoltosság, + / - = Northern analízis eredménye, a körköző jelen volt (+) / nem volt jelen (-) a vizsgált növényi részben.

Amennyiben szisztemikus tüneteket nem figyeltünk meg, a növények fertőzöttségét Northern analízissel vizsgáltuk. A legtöbb tesztnövényen a vizsgált izolátumok egyformán viselkedtek. Érdekes kiemelni, hogy a *C. amaranticolor* növényeken a PSV izolátumok klorotikus lokális léziókat indukáltak, és e mellett a cucumovírusoknál szokatlan módon szisztemikus tünetek, mozaikosodás és levéldeformáció is megjelent (34. ábra). Lencsén és borsón a kísérletek során soha nem figyeltünk meg tüneteket, azonban Northern analízissel a nem fertőzött, csúcsi levelekben a vírus kimutatható volt. Érdekes volt az akác magoncok mesterséges fertőzése is, ahol a fertőzés után kialakultak a tünetek, azonban egy hónappal a fertőzés után a tünetek maszkírozódtak, bár a vírus jelenléte továbbra is kimutatható volt.



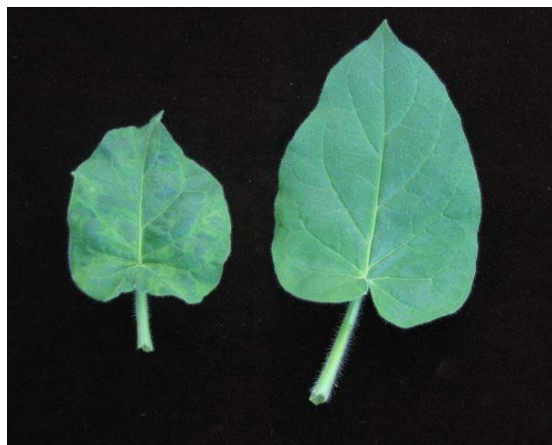
**34. ábra** Tev-PSV okozta tünetek *C. amaranticolor* inokulált (A) és csúcsi levelein (B)

A különböző izolátumok tünetei között csak *N. glutinosa* tesztnövényen tapasztaltunk lényeges eltérést. Az inokulált leveleken tünetek nem alakultak ki, bár itt mindegyik PSV izolátum kimutatható volt. Később az Rp2-PSV, F-PSV, Sz-PSV és a Ljb-PSV esetén figyeltünk meg szisztemikus tüneteket. Ezeknél az izolátumoknál a növények törpülését és mozaik tüneteket figyeltünk meg (35. ábra). A többi izolátum esetén szisztemikus tünetek soha nem jelentek meg, és a vírusok jelenléte Northern hibridizációval sem volt kimutatható (36. ábra).

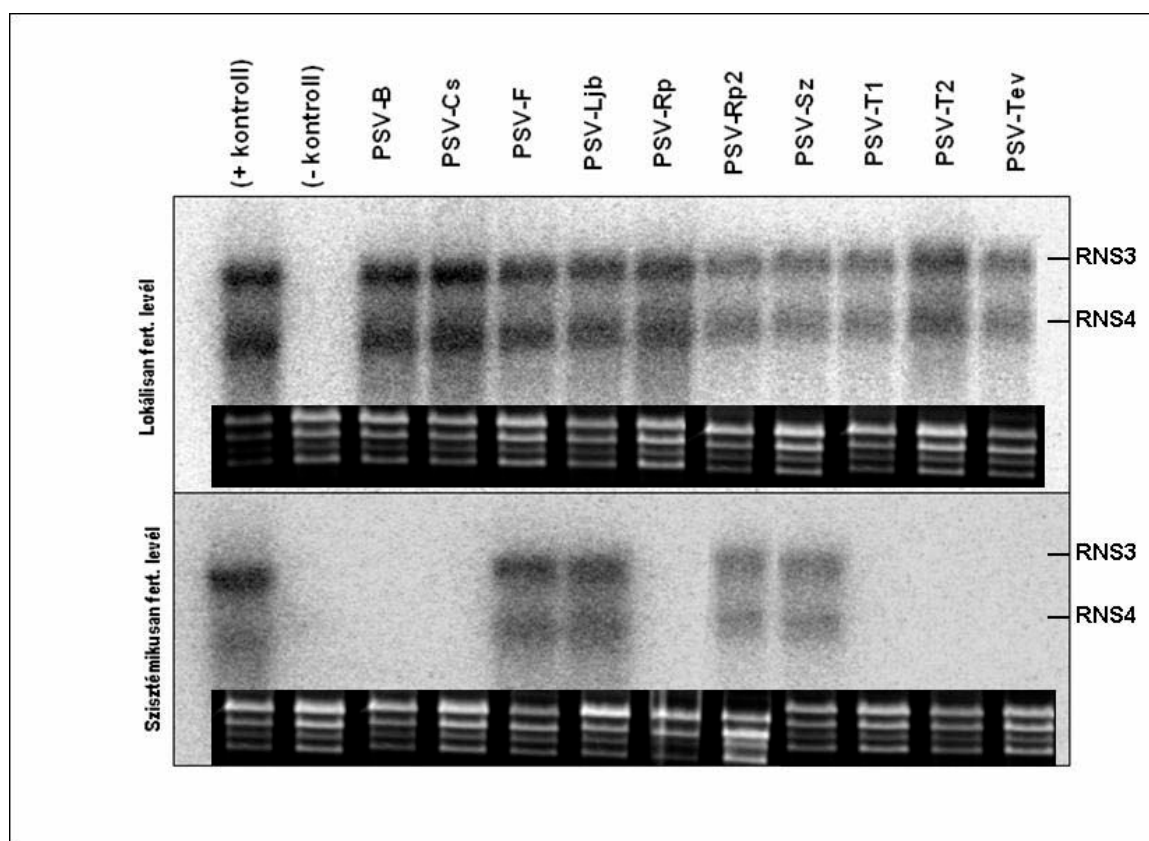


dc\_341\_11

A *Cucumis sativus* cv. Delicates, *Solanum lycopersicum* cv. Kecskeméti jubileum, a *N. debney*, a *N. tabacum* cv. Xanthi gazdanövényeket egyik vizsgált izolátum sem fertőzte.



35. ábra PSV-Rp2 által fertőzött *N. glutinosa* (bal oldalt), és vele azonos korú, egészséges növény (jobb oldalt), azonos levélszintjéről szedett level.



36. ábra PSV izolátumokkal fertőzött *N. glutinosa* növények vizsgálata Northern blot analízissel. Mintavétel a fertőzés után 1 héttel (lokálisan fertőzött levél) és 3 héttel (szisztémikusan fertőzött levél). Fekete alapon a vizsgált növényekből kivont, etídium-bromiddal festett össznukleinsav látható. Pozitív kontroll: PSV-Rp-vel fertőzött *N. benthamiana*, negatív kontroll: nem fertőzött *N. glutinosa*.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Pannon ökorégióban előforduló PSV izolátumok mind patológiai jellemzőiket tekintve, mind genetikailag egységes és jól elkülöníthető alcsoportot alkotnak. Kialakulásuk a II-es és III-as PSV alcsoport közötti rekombinációs eseménnyel hozható összefüggésbe.

#### **4. 6. Egy különleges patotípusú CMV, az Ns-CMV vizsgálata**

Az eddig ismertetett munkák során elsősorban a cucumovírusok RNS3-ának a patológiai jellemzők kialakításában, a gazdanövénykör változatosságában betöltött szerepét vizsgáltuk. Azonban az utóbbi években mind fontosabbá vált az RNS1 és 2 szerepének tisztázása a tünetek kialakításában. Az Ns-CMV izolátum jellemzése ezekhez a munkákhoz járult hozzá.

##### **4. 6. 1. Tünettani vizsgálatok**

Az uborka mozaik vírus N izolátumát eredetileg Fulton (1953) egy pontosan nem megjelölt CMV-törzsből különítette el, és mint véletlen mutánst azonosította. A mutáns izolátum különleges patológiai tulajdonsága abban nyilvánult meg, hogy a legtöbb CMV törzssel szemben szisztemikusan fogékony növényfajokon, így például a *Solanaceae* család fajain is csak lokális léziókat okozott. Az általunk használt Ns-CMV izolátum *N. clevelandii* növények fertőzött levelein lokális léziót, majd szisztemikus fertőzést indukált, míg *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és *N. glutinosa* teszt növényeken csak az inokulált leveleken figyeltünk meg lokális fertőzést, de szisztemikus tünetek nem alakultak ki (37. ábra), és ezekben az esetekben a vírus Northern analízissel sem volt kimutatható a nem fertőzött levelekből (Salamon és mtsai., 1998).



**37. ábra** Az Rs-CMV és az Ns-CMV fertőzés tünetei *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* és *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi teszt növényeken.

#### 4. 6. 2. A nekrotikus tulajdonság genetikai hátterének vizsgálata

A lokális léziók indukálásáért és a szisztemikus tünetek elmaradásáért felelős genetikai determináns azonosításához először elő kellett állítanunk a nekrotikus Ns-CMV törzs fertőzőképes klónjait. Ezeket specifikus primerek felhasználásával, PCR technika segítségével végeztük el. A fertőzéseket követően megállapítottuk, hogy a fertőzőképes klónok a mutáns vírussal megegyező tüneteket indukálnak. A további munkához fontos volt a teljes nukleinsav sorrend ismerete, így meghatároztuk azt, és elhelyeztük a GenBank adatbankban (azonosítási szám: AJ580953, AJ511989 és AJ511990). Az Ns-törzs nukleinsav sorrendjét összehasonlítottuk más CMV izolátumokéval, köztük a laboratóriumunkban használt Rs-CMV izolátuméval is. Megállapítottuk, hogy az

Ns-CMV törzs egy tipikus, első alcsoportba tartozó izolátum. Aminosav szinten az Rs és az Ns-CMV izolátumok 97,5-99 %-os hasonlóságot mutattak.

Az Ns-CMV különleges patológiai jellegének genetikai determinánsának meghatározásához először reasszortáns vírusokat készítettünk az Rs-CMV és az Ns-CMV fertőzőképes klónjainak felhasználásával. A *N. clevelandii* növényeken felszaporított és tisztított virionokkal végeztük el a teszt növények fertőzését (5. táblázat).

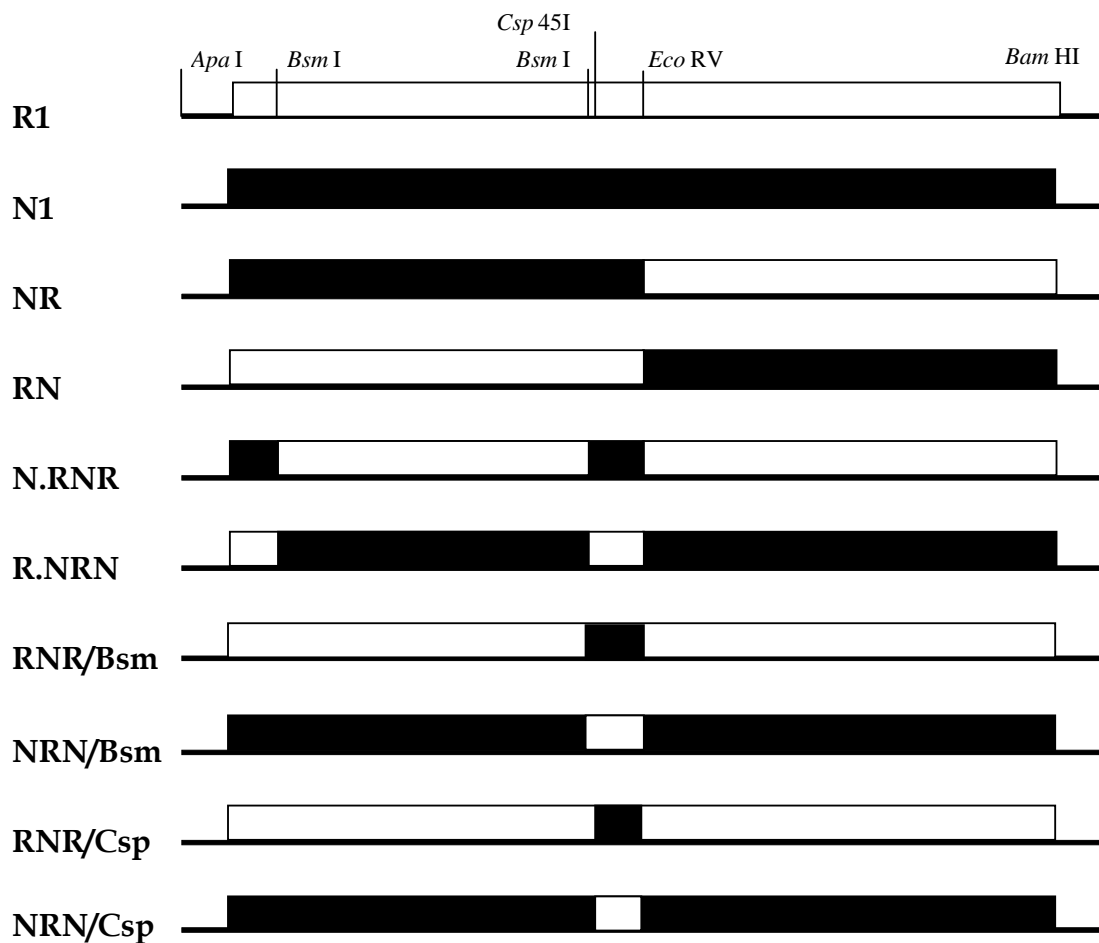
**5. táblázat** Az Ns-Rs reasszortáns vírusok tünetei különböző teszt növényeken.

| genotípus | <i>N. clevelandii</i> | <i>N. glutinosa</i> | <i>N. tab. cv. Xanthi-nc</i> |
|-----------|-----------------------|---------------------|------------------------------|
| R1/R2/R3  | - / ld, mo            | - / mo              | - / ék, mo                   |
| R1/R2/N3  | - / ld, mo            | - / mo              | - / ék, mo                   |
| R1/N2/R3  | - / ld, mo            | - / mo              | - / ék, mo                   |
| R1/N2/N3  | - / ld, mo            | - / mo              | - / ék, mo                   |
| N1/N2/N3  | nl / nl (csn)         | nll / - (mo)        | nll / -                      |
| N1/N2/R3  | nl / nl (csn)         | nll / - (mo)        | nll / -                      |
| N1/R2/N3  | nl / nl (csn)         | nll / - (mo)        | nll / -                      |
| N1/R2/R3  | nl / nl (csn)         | nll / - (mo)        | nll / -                      |

Az első adat a lokális, a második a szisztémikus tünetekre vonatkozik. Zárójelben tüntettük fel a hosszú idő múlva illetve nagyon ritkán megfigyelhető tüneteket. ld: levéldeformáció, mo: mozaik, ék: érkivilágosodás, nl: nekrotikus lézió(k), csn: csúcsnekrózis, nll: nekrotikus lokális lézió.

A teszt növények vizsgálata során megállapítottuk, hogy azokban a vírus RNS kombinációkban alakuk csak ki az Ns-CMV-re jellemző tünetek, amikor az Ns-CMV RNS1 jelen volt. Ha e mellett az RNS1 mellett az Rs-CMV RNS2 és 3 található, a szokatlan tünetek akkor is megjelennek. Így megállapítottuk, hogy kizárólag az Ns-CMV RNS1-en lokalizálódik az a genetikai determináns, ami az Ns-CMV szokatlan tüneteiért felelős.

A továbbiakban rekombináns RNS1 konstrukciókat készítettünk az Rs-CMV RNS1 és Ns-CMV RNS1 fertőzőképes klónok felhasználásával. A mindkét klónban azonos pozícióban megtalálható *ApaI*, *BsmI*, *Csp45I*, *EcoRV* és *BamHI* restrikciós hasítóhelyek felhasználásával (38. ábra).



**38. ábra** Az elkészített Ns-Rs rekombináns konstrukciók sematikus ábrázolása. Fehér színnel az Rs, feketével az Ns-CMV-ből származó részeket tüntettük fel.

Az elkészült konstrukciókkal az Rs-CMV RNS2 és 3 transzkriptumok jelenlétében *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. *Xanthi* és *N. glutinosa* növényeket fertőztünk, és megállapítottuk, hogy az Ns-CMV-re jellemző tünetek csak azoknál a konstrukcióknál alakulnak ki, amelyek az Ns-CMV 1a fehérje 450-477 aminosav szakaszának megfelelő régiót tartalmazta. Ezek az NR, N.RNR, RNR/*Bsm*I és az RNR/*Csp* konstrukciók voltak.

Következő lépésben összehasonlítottuk az Ns-CMV és az Rs-CMV 450-477 aminosavak közötti szakaszát. Megállapítottuk, hogy a két vizsgált CMV izolátum ebben a régióban 5 aminosav pozícióban tér el egymástól (39. ábra).

**Rs-CMV**     **450 SKWFAALTRPLRVFFSSV<sup>H</sup>HALFPTLR**  
**Ns-CMV**     **450 SKWFAAFTRPLCQFFSSAVRALFPTLR**

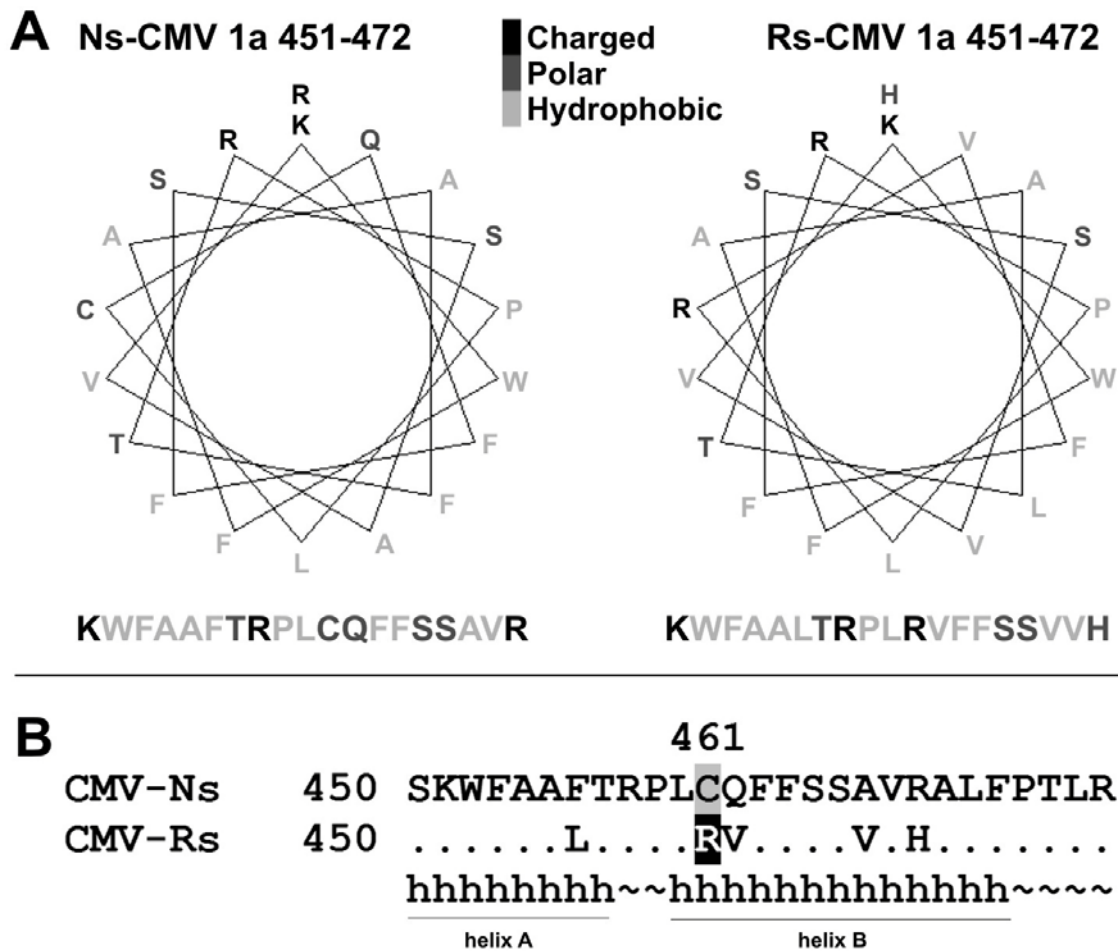
**39. ábra** Az Ns-CMV és az Rs-CMV 1a fehérjének összehasonlítása a klónok *Csp45I* - *EcoRV* hasítóhelyek közötti régiójának megfelelő fehérjeszakaszon. Az eltéréseket piros színnel emeltük ki.

A továbbiakban az eltérő pozíciókat egyesével vizsgáltuk. Az Rs-CMV RNS1 klónjában egyesével, mutációval megváltoztattuk az eltérő aminosavakat az Ns-CMV-ben megtalálható megfelelőire, majd a konstrukciókat tesztnövényeken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a 461-es pozícióban levő arginin cseréje ciszteinre elegendő volt az Ns-CMV-re jellemző tünetek megjelenéséhez. A kísérlet fordítottját is elvégeztük, tehát cisztein helyett arginint építettünk az Ns-CMV 461 as pozíciójába. Ebben az esetben eltűntek az Ns-CMV-re jellemző tünetek, és az I. CMV alcsoportra általánosan jellemző mozaik tüneteket figyeltünk meg.

Tehát az Ns-CMV különleges patológiai jellemzőinek meghatározásáért az 1a fehérje egyetlen aminosava felelős.

#### **4. 6. 3. Az 1a fehérje 461-es pozíciójának részletes vizsgálata**

Az 1a fehérjének nem ismert a másodlagos szerkezete, így a további vizsgálatokhoz elkészítettük a mutáció körüli régió jóslott fehérjeszerkezetét. Az eredmények szerint a 461-es aminosav egy 12 aminosav hosszúságú  $\alpha$ -hélix második aminosavaként helyezkedik el. Ezt az  $\alpha$ -hélixet három aminosav megszakítással egy másik, hét aminosav hosszúságú  $\alpha$ -hélix előzi meg (40. ábra). A két hélix érdekessége, hogy az egyik oldalán elsősorban hidrofób aminosavak helyezkednek el, míg a másik felén bázikus és neutrális aminosavak találhatók. Így az egész régió amfipatikus,  $\alpha$ -hélixnek tekinthető.



**40. ábra A:** Hélix kerék típusú ábrázolása az Ns és Rs CMV 443 és 472 as közé eső régiójának. **B:** Az Ns és az Rs-CMV 1a fehérjéinek vizsgált szakaszának összehasonlítása. A pontok az aminosav azonosságot, h az  $\alpha$ -hélix részt, a ~ pedig a hurok régiót jelöli. A 461-es pozíciót szürke illetve fekete háttérrel emeltük ki.

A 461-es aminosav funkciójának további vizsgálatához mutációkat terveztünk ebben a pozícióban. A modell szerint a 461-es aminosav a hidrofób és a hidrofil-neutrális régió határán található, így a fehérje szerkezet akkor sem változik, ha pozitív töltésű vagy neutrális aminosavval helyettesítjük. Hat pontmutációt terveztünk, amiket az Ns-CMV RNS1 fertőzőképes klónjába építettünk. Az első esetben a C461-t neutrális alaninnel helyettesítettük (C461A). A második mutációnál, amikor egy szerint építettünk be (C461S), azt a feltételezést akartuk ellenőrizni, hogy a C461 részt vesz-e intra- vagy intermolekuláris diszulfid híd kialakításában, és ha igen, akkor ez szükséges-e a nekrozis

kialakításához. A harmadik mutáció során (C461K) azt vizsgáltuk, hogy az arginintől eltérő, más pozitív töltésű aminosavnak milyen hatása van a tünetekre. A negyedik mutáció során prolint építettünk be a vizsgált pozícióba (C461P), ami az ismertetett  $\alpha$ -hélix szerkezetet megbontja. Az ötödik mutációnál hidrophil és poláris aminosav hatását vizsgáltuk (C461N). Végül egy negatív töltésű aminosavat (glutaminsav) is beépítettünk (C461E), ami a hélix amfipatikus jellegét alapvetően megváltoztatja.

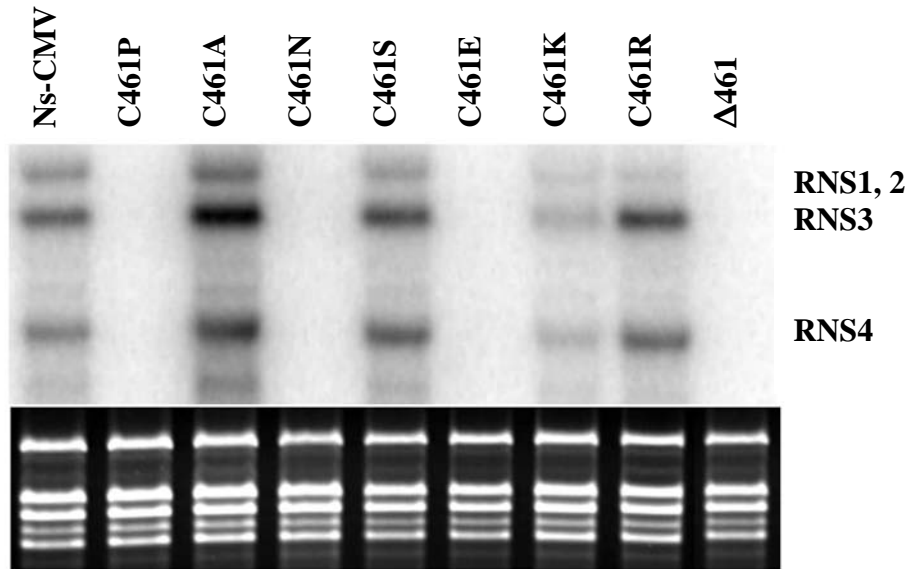
A mutáns klónok replikációját először *N. cleveandii* protoplaszt rendszerben vizsgáltuk. az Ns-CMV RNS2 és 3 jelenlétében. A protoplaszt fertőzése után 24 órával Northern analízissel vizsgáltuk a fertőzés hatékonyságát. A protoplaszt kísérlet eredménye azt mutatta, hogy a C461E, a C461P és a C461N mutáns nem replikálódott. Az összes többi mutáns megtartotta a replikációs képességét, bár a C462K mutáns esetén ennek hatékonysága csökkent (41. ábra).

Mivel mind az Ns-CMV, mind az Rs-CMV szisztemikusan fertőzi a *N. cleveandii* növényeket, a következő fertőzési kísérletekhez ezt a tesztnövényt használtuk. Az összes mutáns az Ns-CMV RNS2 és 3 jelenlétében fertőztük. A fertőzés lefolyását vizuálisan, illetve RT/PCR analízissel követtük nyomon. Ahogy a protoplaszt kísérletekből várható volt, a C461E, a C461P és a C461N mutánsok nem fertőzték a *N. cleveandii* növényeket. Az Ns-CMV és a C461R, a C461S és a C461A mutánsnál 5-6 nappal a fertőzés után jelentek meg szisztemikus tünetek, míg a C461K mutánsnál csak 10-12 nap elteltével figyeltünk meg tüneteket. A szisztemikus tünetek mindegyik esetben hasonlóak voltak, azonban a fertőzött leveleken az Ns-CMV, a C461A és a C461S vírusok esetén lokális léziókat is megfigyeltünk.

A sikeresen fertőző konstrukciók esetén viriont tisztítottunk a fertőzött növényekből, majd az RNS1 1324-2400 nt közötti régiójának megfelelő szakaszt RT/PCR reakcióval emeltük ki. A PCR termékek nukleinsav sorrend meghatározása mindegyik esetben bizonyította a mutációk stabilitását.

A továbbiakban azoknak a tesztnövényeknek a vizsgálatával foglalkoztunk, melyeken az Ns-CMV az I. alcsoportú CMV-ktől eltérő tüneteket mutatott (*N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*) (6. táblázat).





**41. ábra** Fertőzött *N.cleavelandii* protoplasztok Northern analízise. Mindegyik protoplasztot Ns2 és Ns3 transzkriptummal fertőztük a vad típusú illetve a mutáns RNS1 transzkriptumok mellett. A jelölt próba a CMV RNS3 3' terminális régiójával volt komplementer. Az ethidium bromiddal festett riboszómális RNS-ek a Northern blott alatt kerültek bemutatásra.

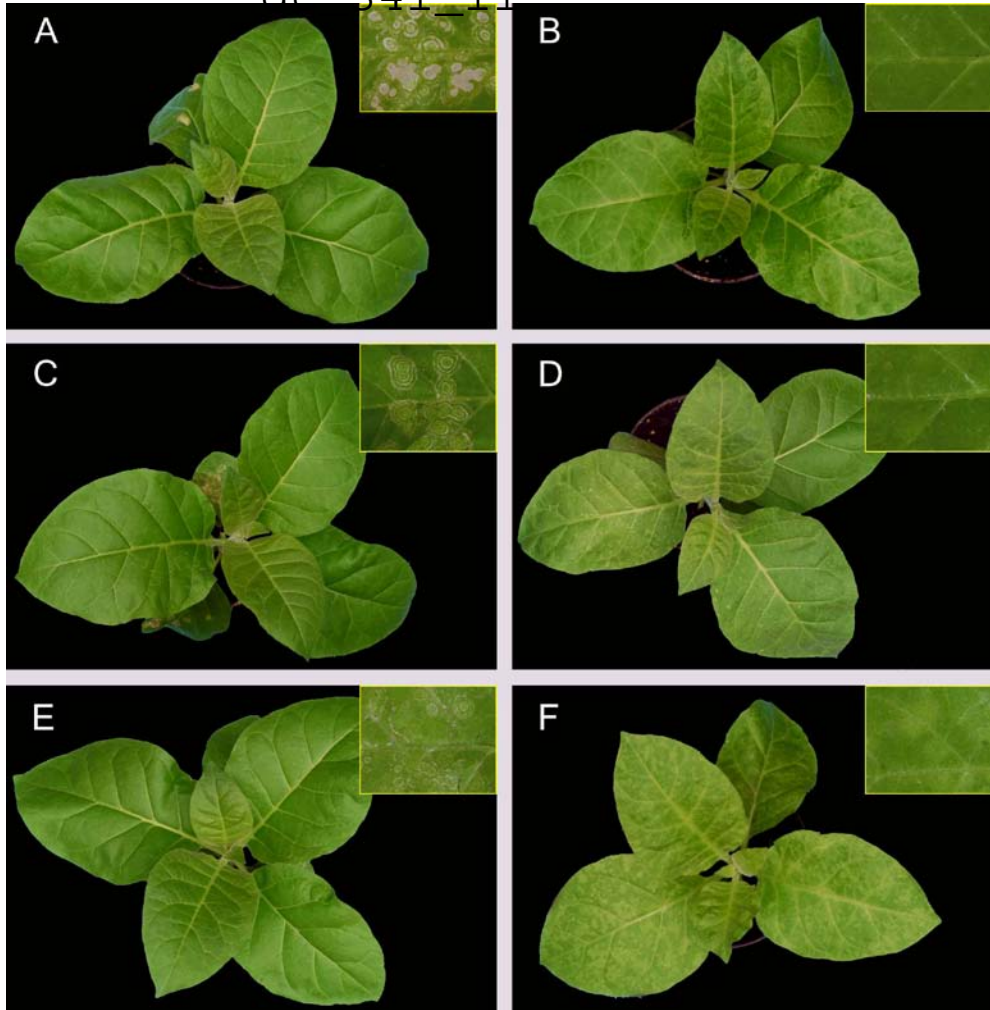
**6. táblázat.** A fertőzött tesztnövényeken kialakuló tünetek típusai

| vírusok       | Fertőzött növényfaj <sup>a</sup> |   |   |
|---------------|----------------------------------|---|---|
|               | <i>Nicotiana cleavelandii</i>    | <i>Nicotiana glutinosa</i>                          | <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <b>Xanthi</b>          |
| <b>Ns-CMV</b> | L, Sys. M.                       | alacsony conc.: L<br>magas conc.: Sys. M.           | alacsony conc.: L<br>magas conc.: Sys. M..          |
| <b>Rs-CMV</b> | M, Sys. M.                       | M, Sys. M.  | M, Sys. M.  |
| <b>C461A</b>  | L, Sys. M.                       | L   | L   |
| <b>C461S</b>  | L, Sy. M.                        | alacsony conc.: L<br>magas conc.: Sys.<br>chlorosis | alacsony conc.: L<br>magas conc.: Sys.<br>chlorosis |
| <b>C461K</b>  | Sys. M. 8 nap                    | Sys. M. 8nap  | Sys. M 8 nap  |
| <b>C461R</b>  | Sys. M. 4 nap                    | Sys. M. 4 nap                                       | Sys. M. 4 nap                                       |
| <b>C461P</b>  | -                                | -   | -   |
| <b>C461N</b>  | -                                | -   | -   |
| <b>C461E</b>  | -                                | -   | -   |

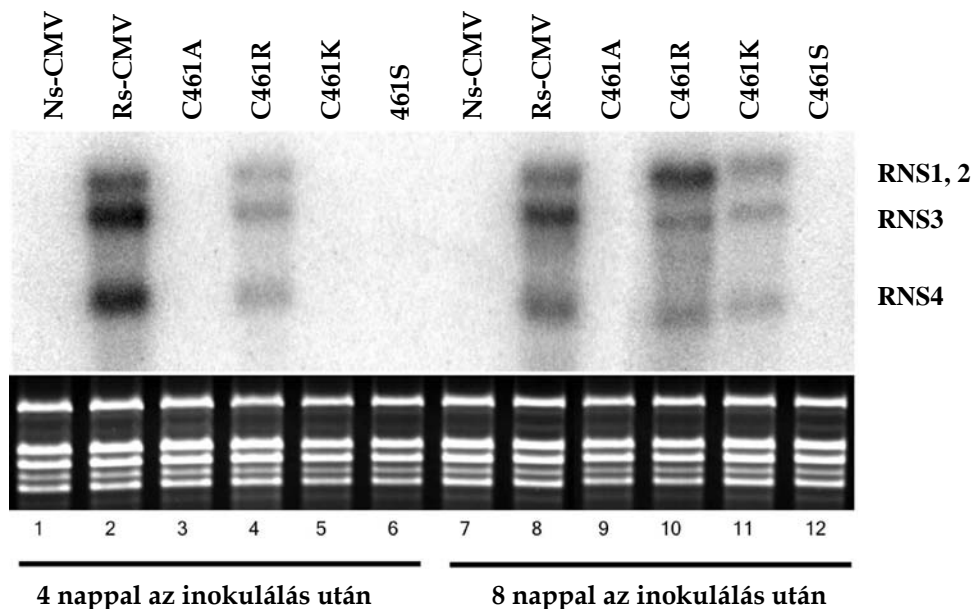
<sup>a</sup>L.=Lézió, Sys.= Szisztemikus tünet, M.=Mozaik, conc.=koncentráció

Ezeknek a tesztnövényeknek a vizsgálatához tisztított virionokat használtuk fel, egységesen 50 µg/ml koncentrációban. A mutánsok közül a C461S és a C461A az Ns-CMV-hez hasonlóan lokális léziókat indukált az inokulált leveleken, és ezekben az esetekben szisztemikus fertőzés nem alakult ki. A kialakult léziók jellege azonban eltérő volt. *N. tabacum* cv. Xanthi növényeken az Ns-CMV fertőzés következtében teljesen nekrotizálódtak, és néhány szaggatott vonalat figyeltünk meg a léziók körül. A C461A vírus esetén a lézió közepe nem nekrotizálódott, de a szaggatott vonalak a fertőzés helye körül jól körülhatárolódtak. A C461S vírus esetén a lokális fertőzés tünetei ugyan jól látszóttak, de sokkal enyhébbek voltak, mint az előző két esetben (42. ábra).

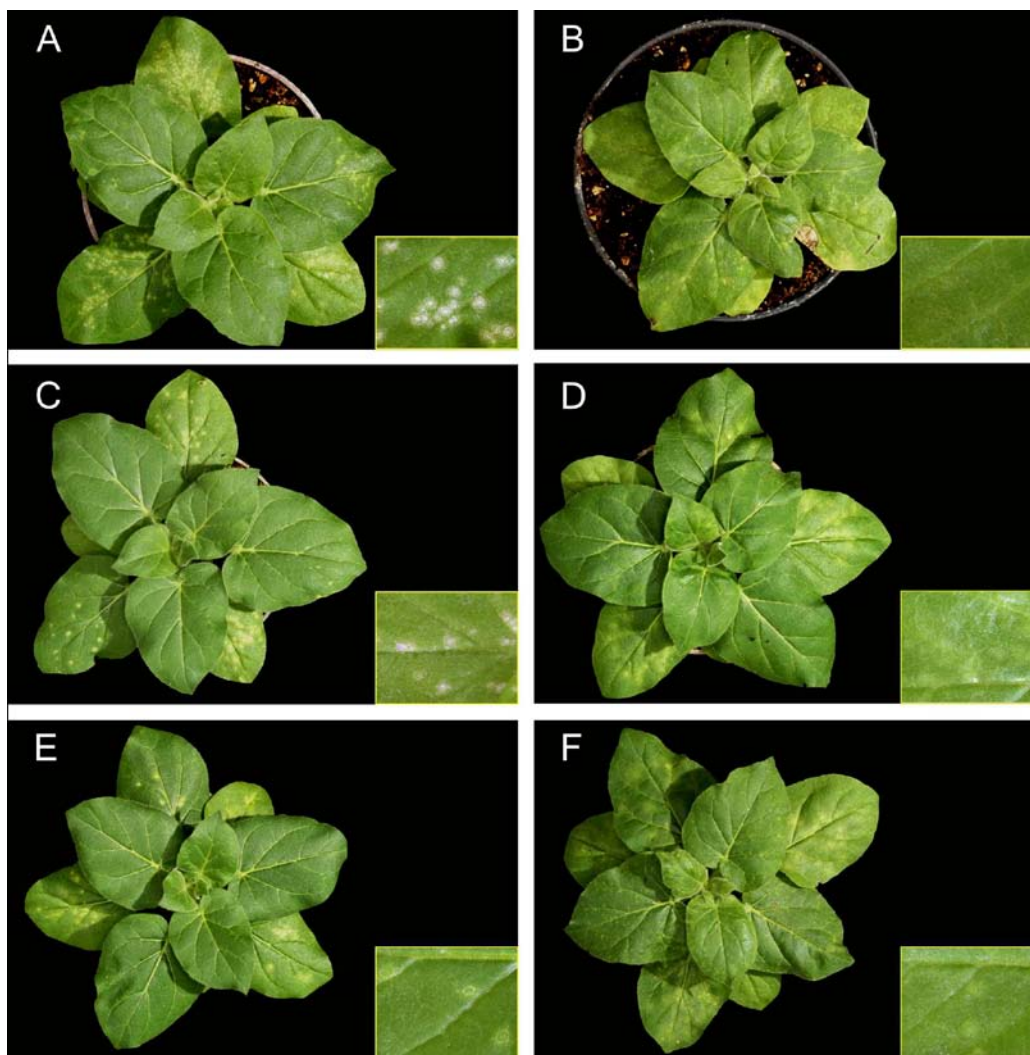
A lokális léziót indukáló izolátumoknál szisztemikus tünetek nem alakultak ki, és ezek a vírusok Northern analízissel sem voltak kimutathatók. A C461K mutáns az Rs-CMV-re emlékeztető tüneteket indukált, azonban ezek a tünetek később, csak nyolc nappal a fertőzés után alakultak ki. A tünettani megfigyeléseinket Northern analízissel is megerősítettük (43. ábra). *Nicotiana glutinosa* tesztnövényen az Ns-CMV és a C461A fertőzéskor alakultak ki nekrotikus léziók az inokulált levélen. A C461S fertőzés következtében tipikus lokális léziók ezen a tesztnövényen nem alakultak ki, inkább csak klorotikus foltokat figyeltünk meg (44. ábra). Ezeknél a mutánsoknál szisztemikus tünetek nem alakultak ki. A C461R vírus az Rs-CMV-hez hasonlóan már 4 nappal a fertőzés után detektálható volt a nem fertőzött felső levelekben, míg a C461K vírust csak 8 nappal az inokulálás után tudtuk kimutatni (43. ábra).



42. ábra *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc növényeken kialakuló lokális és szisztémikus tünetek. A növények a szülői vírusokkal (A: Ns-CMV, B: Rs-CMV) és a különböző mutánsokkal (C: C461A, D: C461K, E: C461S, F: C461R) inokuláltak.



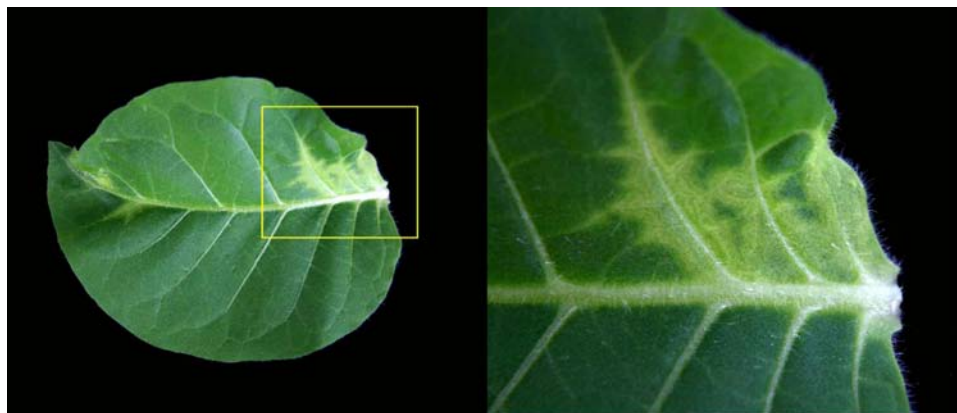
43. ábra *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc növények szisztémikusan fertőzött leveleinek Northern analízise.



**44. ábra** *Nicotiana glutinosa* növényeken kialakuló lokális és szisztemikus tünetek. A növények a szülői vírusokkal (A: Ns-CMV, B: Rs-CMV) és a különböző mutánsokkal (C: C461A, D: C461K, E: C461S, F: C461R) inokuláltak.

A következőkben megvizsgáltuk a fertőzés lefolyását abban az esetben, ha extrém magas víruskoncentrációval inokuláltuk a növényeket (5 mg/ml). A legtöbb esetben a tünetek megegyeztek az előzőekben leírtakkal. A lokális léziót okozó mutánsoknál az inokulált levél teljesen elpusztult, nekrotizálódott. A C461A mutáns esetén soha nem alakult ki szisztemikus tünet, míg az Ns-CMV-nél néhány esetben szisztemikus mozaik tünetek jelentek meg. A vírus nukleinsav sorrendje ezekben az esetekben is stabil maradt, amint azt az RT/PCR nukleinsav sorrend meghatározás bizonyította. A C461S mutánssal történő fertőzés is csak néhány esetben vezetett szisztemikus tünetek kialakulásához, azonban ezeknek a tüneteknek a jellege szokatlan volt (45. ábra). A levélerek körül intenzív, sárga

foltok jelentek meg, azonban ezek a levélnek egy kisebb részére lokalizálódtak. A vírust a levélnek csak a sárga részéből lehetett kimutatni mind RT/PCR, mind Northern analízissel.



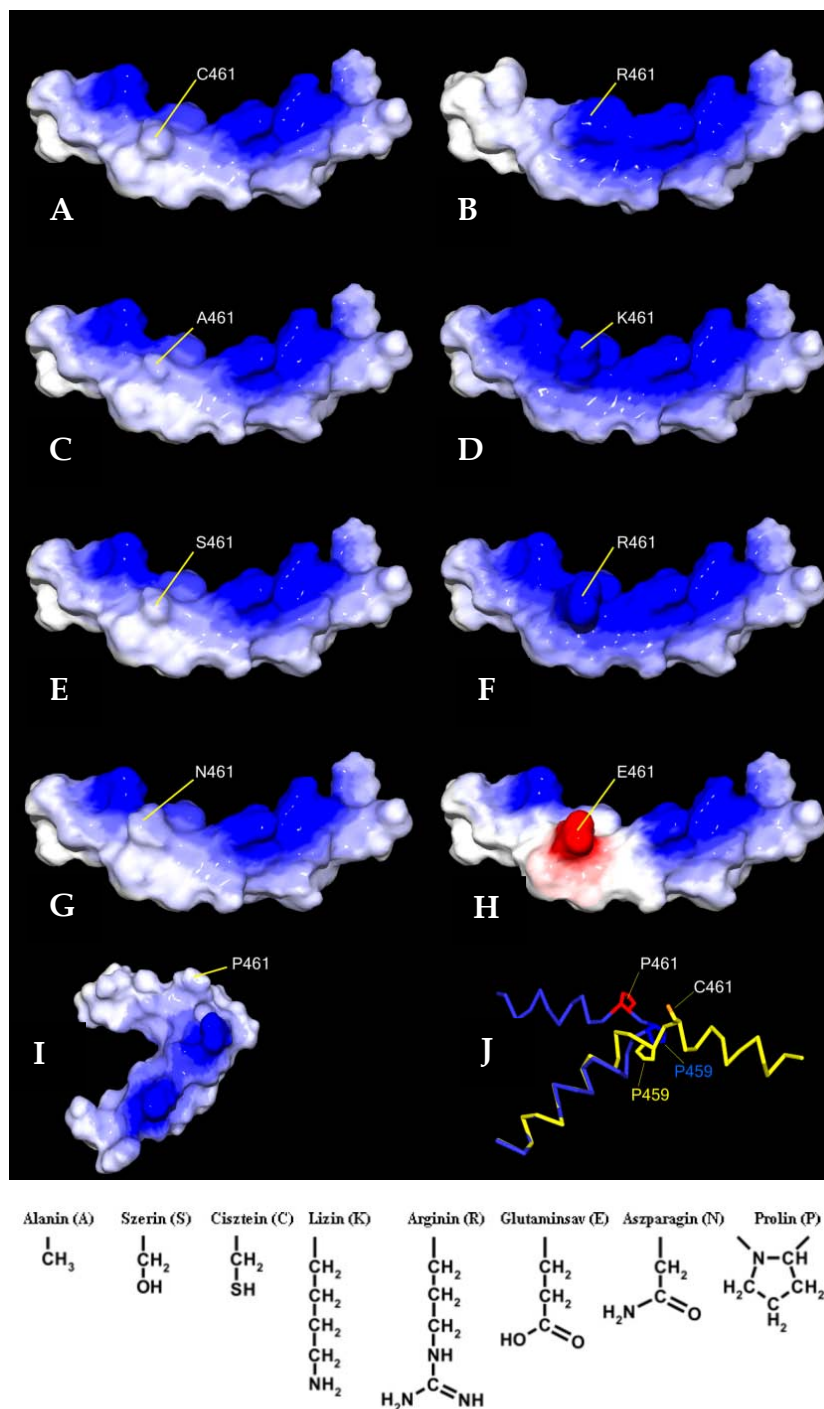
**45. ábra** A C461S mutáns fertőzés után 18 nappal kialakult tünetek a *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi növények nem fertőzött levelén.

#### 4. 6. 4. Strukturális változások az 1a fehérjében a különböző mutációk hatására

A korábban leírtak szerint a vizsgált fehérjeszakasz egy nem teljesen folyamatos, amfipatikus  $\alpha$ -hélixen helyezkedik el. A vizsgált 461-es aminosav a neutrális és bázikus régió találkozásánál lokalizálódik, így fontos szerepe lehet az 1a fehérje különböző funkcióinak kialakításában. Mindegyik mutáns vírus esetén elkészítettük a 461 as körüli régió modelljét (46. ábra). A legnagyobb változás a C461P mutáns esetén jósolható, ebben az esetben az  $\alpha$ -hélix szerkezetben egy erős törés alakul ki. A C461E mutáns esetén a glutaminsav negatív töltésének hatására a hélix töltésviszonyai teljesen megváltoznak, elveszíti amfipatikus jellegét. A protoplaszt kísérletek is bizonyították, hogy ezekben az esetekben annyira megváltozott a fehérje szerkezete, hogy a vírus elveszítette replikációs képességét. Az Ns-CMV-hez hasonló tüneteket indukáló C461A és C461S mutánsok szerkezete is hasonló. Megmarad a hélixek szerkezete, illetve amfipatikus jellegük sem változik.

A C461R illetve C461K mutánsok esetén a hélix szerkezet nem változik, azonban a bázikus rész kiterjedése lényegesen nagyobb.

A C461N mutáns, mely replikációra nem képes, az Ns-CMV-hez hasonló szerkezetű és töltésviszonyú, egyedül a neutrális régió kiterjedése nagyobb, és az oldalcsoport lokalizációja változik.



**46. ábra** A különböző mutációk hatása az 1a fehérje részleges szerkezetére. Mindegyik modell az 1a fehérje részleges, jószolt szerkezetét mutatja be a 443-472 as régióban. **A:** Ns-CMV, **B:** Rs-CMV, **C:** C461A, **D:** C461K, **E:** C461S, **F:** C461R, **G:** C461N, **H:** C461E, **I:** C461P. **J:** A C461P konstrukció esetén mutatja be a szerkezet torzulását. Mindegyik esetben a piros szín a  $-1,8$  kT-nál kisebb potenciálú, a fehér a  $0,0$  potenciálú, míg a kék a  $+1,8$  kT-nál nagyobb potenciálú régiókat jelöli.

## 5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A cucumovírus nemzetségbe tartozó vírusoknak mindössze három genomi RNS-e van, ami csupán öt fehérjét kódol. Ezeknek az RNS-eknek és fehérjéknek együttesen kell biztosítani a vírus "szaporodását", terjedését, alkalmazkodását a változó környezeti viszonyok és gazdanövény kapcsolatok során.

Legtöbb ismeretünk az RNS3 és az általa kódolt fehérjék szerepéről van ezekben a folyamatokban, és a mi munkánk során is ehhez a területhez kapcsolódik a legtöbb eredményünk. A köpenyfehérjét vizsgálva korábban a 129-es aminosav kulcsszerepét több esetben, többféle gazdanövény fertőzése során bizonyították (Suzuki és mtsai., 1991; Suzuki és mtsai., 1995; Kobori és mtsai., 2003; Mochizuki és Ohki, 2011). Arról a mechanizmusról, hogy a 129-es aminosav hogyan befolyásolhatja a tüneteket csak feltételezések vannak. Azt tudjuk, hogy ez az aminosav az összeépült víruspartikulum felületén, a  $\beta$ E- $\alpha$ EF hurok régióban helyezkedik el (Smith és mtsai., 2000), így akár közvetlen kölcsönhatásba is léphet növényi fehérjékkel. A klorózis kialakulását vizsgálva azt találták, hogy a 129 szerin/fenilalanin csere hatással van a vírus becsomagolására, a víruspartikulumok nem épülnek össze, hanem aggregálódnak a citoplazmában, majd a növény nekروزisa következik be (Suzuki és mtsai., 1995). A sárga fenotípus kialakulásáért ugyanakkor a thylakoid membránok abnormalitása volt a közvetlen felelős (Mochizuki és Ohki, 2011).

*Nicotiana glutinosa* növényeken kialakuló különlegesen erős törpülést indukáló genetikai determinánst az R-CMV CP 193-as pozíciójú aszparagin aminosavaként azonosítottuk. A törpülés fenotípusa a vírusakkumuláció változásával nem hozható összefüggésbe, mivel ez olyan gazdanövény fertőzése során is megfigyelhető volt, ahol a két izolátum tünettani eltérést nem indukált. Hasonlóan a mi megfigyeléseinkhez Zhang és mtsai (1994) sem találtak kapcsolatot a tünetek súlyossága és a vírusakkumuláció között, azonban az I17F-CMV által *Solanaceae* családba tartozó fajokon okozott különösen súlyos tünetek magas vírusakkumulációval korreláltak (Carrere és mtsai., 1999). *N. glutinosa* növényen a törpülésszerű fenotípus kialakulásához egyértelműen a sejtosztódás

intenzitásának csökkenése vezet. A legtöbb ismert nukleinsav sorrendű CMV esetén ebben a pozícióban a Trk7-CMV-hez hasonlóan lizin található, az R-CMV-hez hasonlóan csak a Kin-CMV esetében található itt aszparagin, viszont ennek az izolátumnak a részletes patológiai jellemzése nem történt meg. A köpenyfehérje ezen aminosav pozíciójának patológiai jelentőségéről korábban nem jelentek meg adatok. Ez az aminosav pozíció is a 129-es aminosavhoz hasonlóan a víruspartikulum felületén helyezkedik el, a köpenyfehérje  $\beta$ H- $\beta$ I hurok régiójában. Egyrészt nem kizárható, hogy a 193-as aminosav közvetlen kapcsolatba lépjen valamelyik növényi fehérjével, de ennél valószínűbb, hogy a törpüléssel tünet kialakításában a 193-as pozíciót közvetlen megelőző a 189-192 aminosavig terjedő szekvenciárészen (SKDD) azonosított kináz II (CK II) foszforilációs helynek van kulcsszerepe. A 193-as aminosav töltése (aszparagin: poláris, de töltéssel nem rendelkező aminosav, lizin: bázikus, pozitív töltésű oldallánc) befolyásolhatja a kináz kötődését a köpenyfehérje felületén. A jelenlegi kísérleti adatok birtokában a CP foszforilációjának szerepét csak valószínűsíteni tudjuk, ennek bizonyításához további kísérletek szükségesek. Mindenesetre általánosan jellemző, hogy a fehérjék különböző foszforiláltsági állapotban különböző biokémiai utakat indukálhatnak. Még egy, szintén a II. alcsoportba tartozó CMV izolátum ismert, mely *N. glutinosa* tesztnövényen törpülést indukál, a Q-CMV. Ebben az esetben azonban bizonyították, hogy a fenotípus a 2b géntől függ (Ding és mtsai., 1995b). A Q-CMV egyébként a Trk7-CMV-hez hasonlóan lizint tartalmaz a CP 193. pozíciójában, így nyilvánvaló hogy a két esetben eltérő vírus determinánsok indukálhatnak hasonló tüneteket egy adott gazdanövényen.

A tünetek kialakításában a vírusfehérjék mellett számos növényi fehérje/gén is szerepet játszik (Goodman és mtsai., 1986; Matthews, 1991). Az R-CMV által *N. glutinosan* okozott törpülés gazda-specifikus jellege lehetőséget kínálhat arra is, hogy a *N. glutinosa* illetve *N. tabacum* keresztezései segítségével térképezzük a fenotípus kialakításában résztvevő géneket. Ilyen jellegű vizsgálatokat melyben CMV által indukált tünetekért felelős géneket keresték, két esetben végeztek. Az egyik munkában bizonyították, hogy a súlyos klorotikus tünetek kialakulásáért az Y-CMV CP-je illetve két recesszív gazdanövény gén



kombinációja a felelős, melyeket az yb gének környezetére térképeztek *N. tabacum* „Ky57” fajtában (Takahashi és Ehara, 1993). A másik munkában a CMV lokalizációjáért felelős domináns Cry gént azonosították tehénborsóban (Nasu és mtsai., 1996).

A cucumovírusok esetében a CP-nek kitüntetett szerepe van a vírus hosszú távú mozgásában is, hiszen a vírusfertőzésnek ez a lépése víruspartikulum formájában történik (Kaplan és mtsai., 1998, Schmitz és Rao, 1998). Ugyanakkor gyakran a növényi vírusok hosszú távú mozgásának hiánya okozza a vírus szisztemikus terjedésének hiányát, így az adott gazdanövény megmenekülhet a betegség tünetektől és komolyabb gazdasági károk sem keletkeznek. Az uborka termesztésében a CMV már hosszú ideje komoly károkat okoz, míg az általunk használt P-TAV csak lokálisan fertőzi. Éppen ezért vetődött fel annak a kérdésnek a vizsgálata, hogy a hasonló szerkezetű CP alegységekkel és víruspartikulumokkal rendelkező vírusok (Lucas és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2000) hosszú távú mozgása miért különbözik. A két vírus öt, a víruspartikulum felszínén lokalizálódó hurkainak cseréjével első lépésként sikerült a  $\beta\text{B}-\beta\text{C}$  hurok régióra lokalizálnunk egy, a hosszú távú mozgásban kulcsszerepet betöltő részt. Amikor a TAV CP-nek ezt a régióját építettük be a CMV CP-be, akkor a rekombináns csak a két vírus közös gazdanövényén okozott szisztemikus tüneteket, míg az uborkán csak lokális léziókat indukált. Az összes többi hurok régió cseréje nem okozta a szisztemikus terjedés megszűnését, bár a  $\beta\text{E}-\alpha\text{EF}$  hurok csere hatására a vírus szisztemikus terjedése lassabb lett a CMV-hez képest, a vírus két nappal később jelent meg a csúcsi levelekben, valamint a tünetek is halványabbak voltak. Ebben a hurok régióban található a 129-es aminosav is, melyről már korábban leírták, hogy megváltoztatása a vad típusú vírusénál gyengébb tüneteket indukálhat (Mochizuki és mtsai., 2011). Ez a tünettani változás lehetséges, hogy a felszíni hurok régiók flexibilitásának változásával magyarázható, hiszen a CMV  $\beta\text{E}-\alpha\text{EF}$  hurok régiója flexibilisebb mint a TAV megfelelő régiója (Gellért és Balázs, 2010). Korábban Thompson és munkatársai (2006) „alanin scanning” mutagenezissel az öt felszíni hurok régió közül hármat vizsgáltak. A  $\beta\text{D}-\beta\text{E}$ ,  $\beta\text{H}-\beta\text{I}$  és a  $\beta\text{B}-\beta\text{C}$  hurok régiók szerepét is bizonyították a vírus hosszú távú mozgásában az Fny-CMV/tök

vírus-gazdanövény rendszerben. Kísérleteik során több esetben a megváltoztatott nukleinsav sorrend helyett az eredeti állt helyre mutációkkal, ellentétben a mi kísérleteinkkel, amelyek során a beépített mutációk stabilak voltak. Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a CMV és a TAV felszíni köpenyfehérje hurkai közül a  $\beta$ B- $\beta$ C hurok döntő befolyást gyakorol a vírus szisztemikus terjedésére. Ebben a hurok régióban öt aminosav eltérés van a CMV és a TAV CP között. Ezeket a továbbiakban egyenként, illetve kettesével és hármasával vizsgáltuk. *Nicotiana clevelandii* tesztnövényen mindegyik mutáció stabil volt, és a legtöbb esetben a tünetek megegyeztek az R-CMV tüneteivel, azonban az R3E79R mutáns sokkal erősebb tüneteket indukált mint a szülői vírus, erős mozaik tünetek után törpülés, majd csúcsnekrózis alakult ki. Ez a megfigyelés teljesen új volt, korábban CMV izolátumok esetén ennek az aminosavnak patológiai szerepét még nem írták le. A mutáns vírusok szisztemikus terjedését uborka növényen vizsgálva megállapítottuk, hogy két mutáns (R3 E79R, R3PEI-78-80TRT) szisztemikus terjedése gátolt. A 79. aminosav pozícióba egy negatív töltésű aminosav helyére egy pozitív töltésű került, ami alapvetően megváltoztatta a fehérjefelszín elektrosztatikus potenciálját. Ez a töltésváltozás fehérjék közötti kölcsönhatásokra döntő befolyással lehet, például a P48-szerű floém fehérjékkel kialakuló kölcsönhatás kialakulására, ami feltétele a cucumovírusok hosszú távú mozgásának (Requena és mtsai., 2006). Korábban ezt a régiót is vizsgálták alanin-scanning mutagenézissel, de nem találták kulcsfontosságúnak a CMV mozgásában tők növény esetén. A 79. pozíció változtatásával egyáltalán nem, míg a 78-as és 80-as pozícióba alanint építve némileg csökkent a vírus szisztemikus terjedésének hatékonysága (Thompson és mtsai., 2006). Kísérleti eredményeiket megerősítik a mi eredményeink is, hiszen az R3I79A mutáns szisztemikus terjedése uborka növényen is jól működött, azonban más aminosavak beépítése drasztikus változást idézett elő. Ilyen változás volt a tünetek erősödése *N. clevelandii* növényen az arginin beépítésének hatására, valamint ugyanennél a mutánsnál a szisztemikus terjedés hiánya uborka növényen. Érdekes, hogy minden II. alcsoportba tartozó izolátumnál ebben a pozícióban glutaminsav található, míg az I. alcsoport izolátumainál mindig lizin, egy pozitív töltésű aminosav. Ráadásul az

I. alcsoport izolátumai általában hatékonyabban fertőzik az uborkát, erős törpülést és mozaikosságot okozva. Így önmagában a pozitív töltésű oldallánc megjelenése nem indokolja a tünetek, illetve a hosszú távú mozgás jellemzőinek változását. Valószínűleg az aminosav változás hatását egy tágabb környezetben, a hurok régiók flexibilitásának, illetve a teljes fehérjefelszín elektrosztatikus potenciálváltozásának figyelembevételével kell értelmeznünk, valamint a jelenségek teljes megértéséhez szükséges a növényben kölcsönhatásba lépő fehérjék pontos azonosítása. Mivel a CP 78-80 aminosavainak kulcsszerepét bizonyították a kísérleteink a cucumovírusok szisztemikus terjedésében, következő lépésben a TAV CP ezen régióját helyettesítettük a CMV megfelelő régiójával (pT3TRT78-80PEI), illetve a mutáns köpenyfehérjét a CMV MP mellé is beépítettük (pRT3TRT78-80PEI). Bár *N. clevelandii* növényeken a CMV RNS1 és 2 jelenlétében mindkét mutáns fertőzőképesnek bizonyult, az uborka növényeken mindegyik csak lokális fertőzést indukált. Korábban Llamas és munkatársai (2006) az Fny-CMV egy hosszabb régióját (aa 60-148, ami tartalmazta a  $\beta$ B- $\beta$ C,  $\beta$ D- $\beta$ E és a  $\beta$ E- $\alpha$ EF hurok régiókat) is beépítették a TAV CP-be, azonban ez sem volt elég a rekombináns vírus hosszú távú mozgásához uborka növényben. Ebben az esetben az aminosav sorrendben egymás után következő hurkok a fehérje felszín nem szomszédos részen helyezkednek el (Smith és mtsai., 2000), így valószínűleg funkcionális egységet sem alkothatnak. Mindenesetre az általunk vizsgált aminosav triádnak kulcsszerepe van a cucumovírusok szisztemikus terjedésében, de önmagukban nem elegendők a hosszú távú mozgás gazdanövény specifikálásának meghatározásához.

A vírushatás során egy-egy patológiai jellemző gyakran csak egy vírusfehérjéhez, és annak is jól körülhatárolható részéhez köthető, azonban a vírushatás folyamatának legtöbb szakaszához a különböző vírusfehérjék összehangolt működése és kölcsönhatása szükséges. A legrégebben leírt ilyen jellegű kölcsönhatás a replikáz komplex alkotórészei között ismert. A vírusfehérjék közül az 1a fehérje karboxi-terminális része lép kölcsönhatásba a 2a fehérje 126 aminosav hosszúságú amino-terminális régiójával, de ennek a kölcsönhatásnak a kialakulását a 2a fehérje foszforilációja gátolhatja (Kim és

mtsai., 2002; Suzuki és mtsai., 2003). A különböző genomi RNS-ek az egy vírusfajhoz tartozó vírusok esetében szabadon kicserélhetők, így reasszortáns vírusok alakulnak ki. Azonban a különböző cucumovírusok között csak az RNS3 cserélhető ki szabadon, az RNS1 és 2 viszont nem (Rao és Francki, 1981) a két fehérje kompatibilitásának a hiánya miatt (Suzuki és mtsai., 2003). Ugyancsak közvetlen kölcsönhatást mutattak ki a 2a fehérje és a MP között, amiben a 2a fehérje amino-terminális 21 aminosava és a GDD motívum vesz részt, másrészt pedig a MP N-terminális 20 aminosava kell a kapcsolat kialakulásához (Hwang és mtsai., 2005, 2007). Ez a kölcsönhatás feltehetőleg rugalmasabb az 1a-2a kölcsönhatásnál, vagy konzerváltabb fehérjerégiót érint, hiszen reasszortánsok kialakulását nem akadályozza. Korábbi munkánk során megállapítottuk, hogy a CMV és a TAV között az RNS3-on kódolódó két fehérje sem cserélhető ki szabadon. Míg a CMV mozgási fehérjeje mind a CMV mind a TAV CP-vel életképes vírust alakít ki, addig a TAV MP csak a TAV eredetű CP-vel képes együttműködni. Az a rekombináns, mely a TAV MP mellett a CMV CP-t tartalmazza protoplaszt rendszerben replikálódik, de növények inokulálása során már a szomszédos sejtekbe sem képes átjutni (Salánki és mtsai., 1997). Ezeknek az eredményeknek a tükrében vetődött fel az, hogy ennek a két fehérjének a kompatibilitása is szükséges lehet a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez. A CMV és a TAV RNS3 fertőzőképes klónjait használva a rekombináns vírusok után rekombináns MP-t illetve CP-t hordozó vírusokat készítettünk. Egyrészt sikerült a MP karboxi-terminális 29/30 (CMV/TAV) aminosavára lokalizálnunk a CP specifikusért felelős régiót, másrészt a CP 149 karboxi-terminális része szükséges a megfelelő kölcsönhatások kialakításához a MP-nel, így a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez. A CMV MP-ről korábban bizonyították, hogy a karboxi-terminális 33 aminosava a tünetek megváltozása nélkül eltávolítható, és ilyen formájában még egy másik víruscsoportba tartozó vírus, a rozsnok mozaik vírus (*Brome mosaic virus*, BMV) sejtről-sejtre terjedését is képes segíteni (Nagano és mtsai., 1997). Így nem meglepő, hogy ez a fehérjerész az, amelyik a vírusspecifikitást biztosítja. Mindenesetre érdekes, hogy a szélesebb gazdanövénykörrel rendelkező, jelentősebb gazdasági károkat okozó vírus, a CMV MP-je rugalmasabb, mindkét

vírus CP-jével együtt tud működni, míg a TAV MP eredeti formájában csak a saját CP-jének jelenlétében képes a sejtről-sejtre terjedést biztosítani. A MP kicserélt 29 aminosavnyi szakaszában semmilyen, közvetlenül a mozgási funkcióhoz kapcsolódó domént (pl. RNS kötő rész, plazmodezmatához kapcsolódásért felelős domén) nem azonosítottak, azonban a deléciós mutáns MP a vad típusnál erősebb RNS kötő aktivitással rendelkezik (Li és mtsai., 2001). A CP rekombinánsok elkészítéséhez a CP-k aminosav homológia viszonyait vettük alapul, és bár egy homológ régióba került a rekombinációs pont, először csak az egyik köpenyfehérje rekombináns volt fertőzőképes (az, amelyik a TAV amino-terminális része mellett a CMV karboxi-terminális részét hordozta). A szülői és a rekombináns vírusokat vizsgálva a lokális fehérje felszínének elektrosztatikus sajátságainak megváltozását tapasztaltuk a nem működő rekombináns esetén, amit két pontmutációval (62K, 65R) sikerült korrigálnunk. Valószínűleg a vírusfertőzés folyamán elektrosztatikus komplementaritás (Náray-Szabó, 1993) szükséges a CP és egyes növényi illetve vírusfehérjék között a megfelelő kölcsönhatások kialakulásához. Jelenleg még nincsenek adatok arra vonatkozóan, hogy ez a régió milyen közvetlen kölcsönhatásban vesz részt, de kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a fehérje felszín töltéseloszlásának fontos szerepe van a vírus sejtről-sejtre terjedésében a vizsgált gazdanövényeken. A módosítást követően mindkét típusú rekombináns köpenyfehérjéből rendelkezésünkre állt olyan konstrukció, mely a CMV MP jelenlétében fertőzőképes volt. A TAV MP jelenlétében azonban csak az a CP fertőzött aminek amino-terminális része a CMV-ből, karboxi-terminális része pedig a TAV-ből származott. A CMV-ből származó régióban található a vírus becsomagolásához szükséges szekvenciaelemek az első 19 aminosavnyi részen (Schmitz és Rao, 1998), illetve a 15-40 aminosavig terjedő szakaszon (Kaplan és mtsai., 1998). A TAV-ből származó rész hordozza a patológiai szempontból fontos determinánsokat, így a 129-es és 193-as aminosavakat (Suzuki és mtsai., 1995; Shintaku és mtsai., 1992; Perry és mtsai., 1994, 1998; Mochizuki és mtsai., 2011), valamint a felszíni CP hurkok is mind ehhez a részhez köthetők. Mivel a TAV és a CMV CP aminosav sorrendje igen eltérő, a 3D szerkezet hasonlósága ellenére igen nehéz további életképes rekombináns köpenyfehérjéket készíteni. Összességében

elmondhatjuk, hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedéséhez a MP karboxi-terminális 29/30 aminosavának kompatibilitása szükséges a CP karboxi-terminális 2/3-ával.

Mint az előzőekben bemutattuk, a cucumovírusok sejtrő-sejtre terjedéséhez szükség van a MP és a CP jelenlétére, ráadásul ennek a két fehérjének a kompatibilitása is szükséges. Felvetődött az a kérdés, hogy más víruscsoportba tartozó vírus mozgási fehérjéje képes-e helyettesíteni a CMV MP-jét, és ha igen, ennek milyen hatása lehet a vírus fertőzőképességére, gazdanövénykörére és tüneteire. Választásunk a CymRSV MP-re esett, aminek mozgási fehérjéje szintén a 30K-típusú fehérjékhez tartozik, de a vírus köpenyfehérjéje nélkül is képes a sejtről-sejtre terjedést támogatni, sőt egyes *Nicotiana* fajokban a CP jelenléte nélkül még a hosszú távú mozgása is megtörténik (Dalmay és mtsai., 1993). A rekombináns vírus életképesnek bizonyult, egyes gazdanövényeket szisztemikusan, míg másokat csak lokálisan fertőzött. Más vírustaxonómiai csoportok között is sikerült már vírusok roved távú transzport funkcióit komplementálni (Ziegler-Graff és mtsai., 1991; Taliansky és mtsai., 1995). Ráadásul a vöröshere nekrotikus vírus (*Red clover necrotic virus*, RCNV) MP expresszázó növényekben el tudott terjedni egy rovar vírus, a *Flock house virus*, ami képes volt növényi sejtekben is replikálódni (Dasgupta és mtsai., 2001). Gyakran a fertőzőképes kiméra vírusok csak a sejtről-sejtre terjedés képességüket őrzik meg, gyakran nem fertőzik szisztemikusan a szülői vírusok gazdanövényeit (Solovyev és mtsai., 1996). A CMVcymMP vírus igen virulensnek tekinthető, hiszen hatékonyan mozog mind sejtről-sejtre, mind pedig szisztemikusan. Ehhez valószínűleg egyrészt a CymRSV MP jellege járulhat hozzá, ami genetikai háttértől függetlenül képes a növényi vírusok transzportját elősegíteni, valamint kicsi mérete, esetleg másodlagos szerkezete is kedvező lehet. Másrészt a CMV kicsi, osztott genomja megfelelő recipiensnek bizonyult. A növényi vírusoknál a megjelenő tünetek típusa a különböző növényi illetve vírus eredetű fehérjék, illetve az RNS-ek kölcsönhatásának az eredménye. A vírusok MP-je a mozgásban való részvétel mellett jelentősen befolyásolja a tünetek kialakulását mind a cucumovírusoknál, mind a tombusvírusoknál (Carrére és mtsai., 1999; Chu és

mtsai., 1999). Azoknál a gazdanövényeknél ahol mindkét szülői vírus lokális léziót indukál (*C. quinoa*, *C. foetidum*, *C. murale*) a hibrid vírus is lokális léziót okozott, aminek fenotípusa a CymRSV tüneteire emlékeztetett. Ez az eredmény alátámasztja a korábbi, más vírusoknál történt megfigyeléseket, miszerint a lokális lézió jellegében meghatározó szerepe a MP-nek van (Nejidat és mtsai., 1991; Solovyev és mtsai., 1996). Azoknál a gazdanövényeknél, amelyeket mindkét szülői vírus szisztemikusan fertőz, a hibrid vírus is szisztemikus tüneteket alakított ki, de a tünetek típusa egyik szülői víruséval sem egyezett meg. Ez érthető is, hiszen a MP más genetikai állományba került, egy új genomkombináció jött létre. A legérdekesebb azoknak a növényeknek a csoportja volt, ahol az egyik szülői vírus csak lokális, míg a másik szisztemikus fertőzést indukál. Ezek közül kettőnél (*N. tabacum* cv. Xanthi, *N. debney*) szisztemikus vírusfertőzést figyeltünk meg, míg a *N. glutinosa* növényénél csak lokális fertőzés alakult ki. Ezek a fertőzések arra utalnak, hogy a különböző gazdanövényeken a CymRSV más-más génje a hiperszenzitív válaszreakció elicitora. Míg a *N. glutinosa* növényénél az elicitor funkciót a MP önmagában betölti, addig az *N. tabacum* cv. Xanthi-nc esetén másik CymRSV gén szerepel elicitorként. Eredményeink Scholthof és mtsai (1995) eredményeivel vonható párhuzamba, aki burgonya x vírus (*Potato virus x*, PVX) vírusvektort használva megállapította, hogy a paradicsom bokros törpülés vírus (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) által indukált hiperszenzitív reakciót *N. glutinosa* növényeken a MP indukálja, míg *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növényeken a p19 fehérje az elicitor. Az eredményeink ebben az esetben is a vírus-gazdanövény rendszer komplexitását bizonyítják, tehát a rendszer egy-egy összetevőjének megváltoztatása (legyen az a gazdanövény vagy a vírusfehérje) alapvetően befolyásolja a fertőzés lefolyását.

A növényi vírusok genomja folyamatosan változik, így biztosítva az alkalmazkodás és megújulás lehetőségét. A változékonyság fő formája a rekombináció illetve az RNS replikáció során bekövetkező mutációk. A cucumovírusok közül a PSV az, amelyiknek változékonysága és az izolátumok rokonsági viszonyai legkevésbé ismertek. Az 1980-as években szerológiai módszerekkel vizsgált izolátumok és napjaink nukleinsav alapú besorolása közt

még mindig nem teljes az egyezés. Xu és mtsai. (1986) szerológiai vizsgálatok alapján négy szerotípust azonosítottak az USA-ban, míg Richter és mtsai. (1987) az európai izolátumokat hat szerológiai csoportba sorolták, ráadásul a fehérakácról származó izolátumot önálló vírusként (*Robinia mosaic virus*) tartották számon (Schmelzer, 1971; Richter és mtsai., 1979). Sajnálatos módon ezen munkák során feldolgozott izolátumok elvesztek, így további, nukleinsav alapú besorolásuk nem lehetséges. A nukleinsav alapú azonosítás során munkánkat megelőzően a PSV izolátumokat három alcsoportba sorolták (Naidu és mtsai., 1995; Hu és mtsai., 1997, 1998; Yan és mtsai., 2005). Munkánk során izolált Rp-PSV teljes nukleinsav sorrendjét meghatároztuk és megállapítottuk, hogy mérete és génjeinek elhelyezkedése megegyezik a cucumovírusokra jellemző adatokkal és a cucumovírusokra jellemző összes szekvencia motívum is azonosítható volt. Az 1a fehérje N-terminális részén megtalálható a metiltranszferáz doménekre jellemző H...DxxR...Y motívum, aminek a genomi és szubgenomi RNS-ek CAP struktúrájának kialakításában van jelentős szerepe. Szintén jelen van az a prolin gazdag rész, amely az 1a fehérje metiltranszferáz és helikáz doménjét választja el (O'Reilly és mtsai., 1998). A 2a fehérje e 601-603 aminosav pozíciójában azonosítottuk a GDD motívumot, amely rész az RNS függő RNS polimerázok Mg<sup>2+</sup> kötésében meghatározó (Argos, 1988). A 2b fehérjében jelen van a bázikus aminosavakban gazdag sejtmagi lokalizációs szignál (Lucy és mtsai., 2000). A 3a fehérjében megfigyelhető a „30K” mozgási fehérje szupercsaládra jellemző 33 aminosav hosszúságú erősen konzervált régió (Mushegian és Koonin, 1993). Mindhárom genomi RNS 5' nem kódoló részén jelen van az a 40 nukleotid hosszúságú konzervált régió, amely a vírusreplikációban játszik meghatározó szerepet (McGarvey és mtsai., 1995; Boccard és Baulcombe, 1993). Az Rp-PSV RNS-einek teljes nukleinsav sorrendje a különböző alcsoportokból származó PSV izolátumok nukleinsav sorrendjével 77,6-84,2 % azonosságot mutatott. Ezen értékek alapján és az ICTV cucumovírusokra ajánlott kritériumai alapján (Roosinck és mtsai., 2006) az akácról izolált Rp-PSV egyértelműen a *Peanut stunt virus* fajhoz tartozó izolátum. Egy alcsoportba azon izolátumok sorolhatók, melyek nukleinsav sorrend azonossága 90 %-nál nagyobb, míg a fajon belül, alcsoportok



között az elvárt érték 70-80 % közötti (Hajimorad és mtsai., 1999). Az Rp-PSV nukleinsav sorrendje alapján határozottan elkülönül a korábban leírt izolátumoktól, így mindenképpen indokolt a IV. PSV alcsoport bevezetése, és ebben az alcsoportban az Rp-PSV tekinthető az alcsoportra jellemző típusizolátumnak. Korábban akácról származó PSV izolátumokat szerológiai jellemzők és hibridizációs eredmények alapján próbálták a leírt PSV alcsoportokba besorolni, de úgy találták, hogy mind az I. mind a II. alcsoporttól egyforma távolságra helyezkedik el (Militao és mtsai., 1998). Az Rp-PSV teljes nukleinsav sorrendjének birtokában ezek a korábbi eredmények teljesen érthetővé váltak, hiszen homológia viszonyok alapján mindkét izolátumtól távol helyezkedik el. Az RNS3 részletes nukleinsav sorrend analízise bizonyította, hogy a PSV izolátumok evolúciójában a rekombináció fontos szerepet játszott. Az egyik rekombinációs pontot az RNS3-on lokalizálódó két gén között, az intergénikus szakaszban találtuk, míg a másik a CP-ben, 47 nukleotiddal a stop kodon előtt helyezkedik el, így a rekombináció során majdnem a teljes CP cseréjére sor került. Az RNS3-ban TAV és CMV, illetve különböző alcsoportokhoz tartozó CMV kevert fertőzések esetén üvegházi körülmények között azonosítottak rekombinációs pontokat. Ezekben az esetekben a rekombinációs pontok egyenesen oszlottak el az RNS3-on, megtalálhatók voltak mindkét fehérjét kódoló részekben illetve az intergénikus szakaszokon is, azonban ezeknek a rekombinánsoknak az életképessége rosszabb volt a szülői vírusokénál (de Wispelaere és mtsai., 2005; Pierrugues és mtsai., 2007). Bonnet és mtsai. (2005) arra a következtetésre jutottak, hogy egész vírusfehérjék cseréje rekombinációval a vírusevolúció során mindig kedvezőbb, mint a rekombináns fehérjék létrejötte. A rekombináció szerepét a cucumovírusok evolúciójában régóta vizsgálják és természetes környezetünkből származó izolátumok esetén eddig az IA és IB izolátumok esetén „ribonukleáz protection assay” módszerrel azonosítottak rekombinánsokat. Sajnos ezeknek a rekombinánsoknak a pontos nukleinsav sorrendje nem ismert, így a rekombinációs pont sem került azonosításra (Bonnet és mtsai., 2005; Escribe és mtsai., 2007). A korábbi munkák azt támasztották alá, hogy az osztott genom szegmenseinek cseréje illetve a rekombináció hatására is csökken a vírus „fitnesz”, éppen ezért a szelekció ezek

ellen a folyamatok ellen dolgozik, és így a hibrid genotípusok eltűnnek a vírus populációból (Bonnet és mtsai., 2005; Pierrugues és mtsai., 2007). Néhány esetben azonban a rekombinációnak szelekciós előnye lehet, és ilyen esetekben válhatnak dominánssá a vírushpopulációban a rekombinánsok. Erre lehet példa egy *Alstromeria*-ról izolált CMV (Chen és mtsai., 2002). Az Rp-PSV köpenyfehérjéje legnagyobb része a III. alcsoportba tartozó Mi-PSV-vel mutatja a legmagasabb homológiát, míg az RNS3 többi régiója a II. alcsoportba tartozó W-PSV-re hasonlít jobban. Hogy ennek a rekombinánsnak a keletkezése mikor történt, illetve jelentett-e valamilyen előnyt speciális (pl. az akác) gazdanövények fertőzése során jelenleg nem ismert. Az Rp-PSV jellemzése felvetette azt a kérdést, hogy egyedi, különleges izolátumot találtunk, vagy a Pannon ökorégióban ez egy elterjedt, jellemző izolátum. Korábban hazánkban egy vörös heréről gyűjtött PSV-Tp izolátum részletes szerológiai és gazdanövénykör vizsgálata során bizonyították, hogy az akkor ismert egyik alcsoportba sem sorolható (Beczner és Devergne, 1979). Sajnos ez az izolátum is elveszett, így ennek molekuláris jellemzését nem tudtuk elvégezni. Fehér akác növényekről további kilenc izolátumot gyűjtöttünk, és ezek részleges molekuláris jellemzését végeztük el. Mindegyik esetben az RNS3 olyan részleges cDNS klónjait állítottuk elő, melyek mindkét rekombinációs pontot tartalmazták. A nukleinsav sorrend meghatározás és részletes szekvencia analízis bizonyította, hogy a Pannon ökorégió területén a rekombináns PSV izolátumok fordulnak elő, amelyek mintegy 96,3-98 % homológiát mutatnak nukleinsav szinten, ami jóval meghaladja az egy alcsoportba soroláshoz szükséges 90%-os értéket. A legnagyobb különbséget egy Mezőcsáton gyűjtött PSV izolátum esetén találtuk, ahol az RNS3 3' nem kódoló régiójában egy 196 nukleotid hosszúságú duplikációt találtunk. Ilyen jellegű duplikáció a PSV esetében eddig nem volt ismert, azonban TAV izolátumok esetén már megfigyelték (Palukaitis és Garcia-Arenal, 2003). Ezek alapján a Pannon ökorégióból származó 9 izolátum az Rp-PSV-vel szoros kapcsolatban áll, mindegyik a IV. alcsoportba tartozó izolátumnak tekinthető. A fehérakácról származó PSV izolátumok gazdanövénykörét és tünettípusait vizsgálva lényeges különbségeket nem találtunk. A többi alcsoportba képes lényeges eltérést *Chenopodium amaranticolor*

növényeknél találtunk. Ezen a gazdanövényen az Rp-PSV szisztemikus fertőzést, mozaik tüneteket és erős levéldeformációt okoz, míg a III. alcsoportba tartozó izolátumok ugyan szisztemikusan fertőzik a *Ch. amaranticolor*-t, de a csúcsi leveleken csak mozaik tünetek alakulnak ki levéldeformáció nélkül (Xu és mtsai., 1998). Több, patológiailag jellemzett PSV izolátumról ismert, hogy a *Ch. amaranticolor*-t csak lokálisan fertőzi (Mink és mtsai., 1969; Beczner és Devergne, 1979). Az Rp-PSV izolátumok szisztemikus terjedésében *Nicotiana glutinosa* növényeken találtunk egyedül különbséget. Míg az izolátumok egy része szisztemikusan fertőzte ezt a gazdanövényt, több izolátum csak lokális fertőzést okozott. Eddig a cucumovírusoknál a szisztemikus terjedésben elsődleges szerepet a köpenyfehérjének tulajdonították (Taliensky és Garcia-Arenal, 1995; Salánki és mtsai., 1997), valamint a 2b fehérje szerepét bizonyították még (Du és mtsai., 2008). Ebben az esetben feltehetőleg nem a köpenyfehérjékben van a döntő különbség, mivel nukleinsav illetve aminosav sorrendjeik meghatározása során nem találtunk olyan eltérést mely konzekvensen lenne jelen a lokálisan fertőző illetve szisztemikus izolátumokban. Így valószínűleg a 2b fehérjében kell keresnünk a *N. glutinosa* növény fertőzése során megfigyelt különbség genetikai hátterét. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a Pannon ökorégió területén azonosított PSV izolátumok egy egységes és jól elkülöníthető csoportot, a PSV IV. alcsoportját alkotják és az alcsoport kialakulásában RNS rekombinációnak is szerepe volt. Továbbra is kérdéses, hogy ez az izolátum a természetben az akácon kívül más gazdanövényen is előfordul-e, valamint, hogy Európában illetve más kontinenseken akác növényeken milyen PSV izolátumok fordulnak elő.

Eddigi munkáink mind a cucumovírusok RNS3-hoz köthetők, azonban a patológiai jellemzők kialakításában az RNS1 és 2 által kódolt fehérjék is részt vesznek. Erre példa az Ns-CMV vizsgálata, ahol egy különleges fenotípus kialakításában az 1a fehérje 461-es aminosava bizonyult kulcsfontosságúnak. Ez a megfigyelésünk megfelel Lakshman és Gonsalves (1985) eredményeinek, akik az N-CMV törzs nekrotikus tüneteinek kialakulásáért szintén ezt a genomi szegmenst tették felelőssé. Kísérleteikhez még nem állt rendelkezésre biológiailag aktív transzkriptum, ezért a reasszortáns vírusok előállításához a szülői vírusok

genomi RNS-eit gélből izolálták. A CMV 1a fehérje szerepéről a tünetek módosításában kevés adat áll rendelkezésünkre, azonban erre mégsem a nekrotikus izolátum az egyetlen példa. A „Black Beauty” cukkini fajtán (*Cucurbita pepo* convar. *giromontia* cv. Black Beauty) az I. alcsoportba tartozó CMV izolátumok felhasználásával (Fny-CMV, Sny-CMV) bizonyították, hogy az 1a fehérjének a tünetek súlyosságának és a hosszú távú mozgás sebességének meghatározásában döntő szerepe van, miközben a két izolátum replikációjának hatékonysága megegyezik (Roossinck és Palukaitis, 1990; Gal-On és mtsai, 1994).

A CMV 1a funkcióit és szerkezetét illetően nagyon kevés közvetlen irodalmi adat áll rendelkezésünkre, viszont a szintén *Bromoviridae* családba tartozó BMV 1a fehérjét részletesen vizsgálták. Bár a két 1a fehérje aminosav szinten csak 55%-os homológiát mutat, szerkezeti elemeik megfeleltethetők egymásnak (O'Reilly és mtsai, 1998). Funkcionális vizsgálatok alapján a 461. aminosav az 1a N-terminális felén elhelyezkedő metiltranszferáz domén része (Kong és mtsai, 1999; O'Reilly és mtsai, 1998). Enzimatis aktivitásán kívül e doménon keresztül valósul meg az 1a-1a fehérje dimerizáció, melyről azt feltételezik, hogy a replikáz komplex kialakulásának első lépése, és így elengedhetetlen a vírus működéséhez (O'Reilly és mtsai, 1998). Az 1a fehérje másodlagos szerkezetének modellezése alapján a 461. aminosav egy amfipatikus  $\alpha$ -hélix részét képezi, amely fontos szerepet játszhat az 1a fehérje stabilizálásában (O'Reilly és mtsai, 1998). Ha a CMV 1a fehérjében is azonosított C-terminális helikáz domén globuláris szerkezete megbomlik (O'Reilly és mtsai, 1995), akkor a replikáz komplex létrejöttéhez szükséges 1a-2a kölcsönhatás is lehetetlenné válik (Kim és mtsai, 2002). A BMV 1a fehérje főleg a 367-480. aminosavak közötti szakasz segítségével kötődik membránhoz (den Boon és mtsai, 2001) ami szerkezeti elemeit tekintve megfelel a CMV 397-496. aminosavak közti régiójának. Érdekes módon a membránkötődésért felelős fehérjerészlet nagymértékben átfed az 1a globális stabilitását befolyásoló  $\alpha$ -hélixszel (O'Reilly és mtsai, 1998). Ez az egybeesés azt a lehetőséget is felveti, hogy a 461. aminosav környezete mind a konformáció stabilizálásában, mind a replikáció alapfeltételét jelentő membránasszociációban is kulcsszerepet játszhat. Az általunk vizsgált mutánsok közül három esetben bizonyítottuk az 1a fehérje

alapvető funkciójának, a replikációnak a gátlását. A C461P mutáns esetén az amfipatikus  $\alpha$ -hélix szerkezet alapvetően megváltozott, a prolin beépítése törést okozott ebben a régióban, aminek következménye a teljes fehérjeszerkezet változása lehet. A C461E mutánsnál alapvető elektrosztatikus potenciálváltozás történt, ami a hélix alapvető szerkezetét nem befolyásolta, és a hidrofób rész töltéseloszlása, ami feltehetően a membránhoz kapcsolódást biztosítja nem változott. Ugyanakkor a hidrofil rész töltésének alapvető változása a fehérje-fehérje kölcsönhatásokra alapvető befolyással lehet. Váratlan eredmény volt azonban, hogy C461N mutáns nem replikálódott protoplaszt rendszerben. Mivel ebben az esetben a hélix szerkezet illetve a töltéseloszlás sem változik, feltételezhető, hogy a hélix a komplex 1a fehérje felszínén található és közvetlen és nélkülözhetetlen szerepet tölt be a vírusreplikációban.

Az összes többi mutáns replikálódott *N. clevelandii* protoplaszt rendszerben, azonban a továbbiakban két különböző válaszreakcióval talákoztunk a növények fertőzése során. Azoknál a mutánsoknál ahol a 461-es aminosav oldallánca pozitív töltésű (C461K, C461R) szisztemikus fertőzés alakult ki. A C461K mutáns replikációjának hatékonysága az összes többi mutánsénál gyengébb volt, és valószínűleg ennek következtében alakult ki a szisztemikus fertőzés 3-4 nappal később, mint a C461R mutáns esetén.

Az Ns-CMV, a C461A és a C461S vírusok esetében hiperszenzitív reakció alakult ki a *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és *N. glutinosa* növények fertőzése során. Az 1a fehérje 461. aminosavának a gazdanövény hiperszenzitív reakciójának (HR) elindításában játszott szerepét a „gén a génhez” (gene-for-gene) elmélet segítségével értelmezhetjük. A „gén a génhez” elmélet szerint a HR kialakulásának előfeltétele egy gazda által kódolt receptor és az avirulencia faktor kompatibilis kölcsönhatása (Gabriel and Rolfe, 1990; Keen, 1990), ezért feltételezhetjük, hogy a 461-es aminosav cseréje olyan módon változtatja meg annak szerkezetét (ezáltal esetleg a különben rejtett domének hozzáférhetőségét) vagy felületi töltéseloszlását, hogy a fehérje a HR-t elindító receptor liganduma legyen. Lehetséges, hogy az 1a fehérje nem közvetlenül lép kölcsönhatásba az R proteinnel, hanem gazdafaktorokon keresztül, mint azt több esetben HR

kialakulása során feltételezték (Dangl and Jones, 2001; Schulze-Lefert, 2004). A HR-nek két alapvető, könnyen azonosítható jellemzője van. Egyrészt a fertőzés közvetlen helye körül nekrozis alakul ki a sejtek elpusztulásának következtében, másrészt a patogén lokalizálódik a növénynek erre a szegmensére. A karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) által *Nicotiana* fajokon kialakuló HR esetén bizonyították, hogy a rezisztencia illetve a nekrotikus sejthalál különválasztható (Cawly és mtsai., 2005) és külön-külön is indukálhatók (Cole és mtsai., 2001). Már a CMV esetében is sikerült a nekrotikus reakciót a vírus lokalizációjától elválasztani tehénborsó gazdanövény esetén (Kim és Palukaitis, 1997). Az általunk vizsgált mutáns vírusok esetén a C461A és a C461S mutánsok esetén a vírusrezisztencia kialakult, míg a nekrozis nem indukálódott. Ezekre a kísérleti eredményekre teljes magyarázatot majd csak a kölcsönhatásban résztvevő fehérjék azonosítása, és a biokémiai utak teljes ismeretében tudunk majd adni. Egy vírusfertőzés következménye nagyon sok tényezőtől függhet, például a hőmérséklettől (Erickson és mtsai., 1999; Tarapowala és Culver, 1996) vagy a növény fejlődési stádiumától (Zheng és mtsai., 2004). A kísérleteink a fertőző vírus koncentrációjának fontosságát is bizonyították. Nagyon magas koncentrációjú vírust használva inokulumként, a HR helyett szisztemikus fertőzés alakulhat ki (Ns-CMV, C461S), azonban a C461S vírus esetén később a szisztemikusan fertőzött levél kisebb szegmensében lokalizálódik a vírus. Ebben az esetben valószínűleg a rezisztencia kialakulása nem elég gyors ahhoz, hogy a magas koncentrációjú vírust a fertőzött sejtek közvetlen környezetébe lokalizálja, azonban a növényi védekező rendszer a szisztemikus levelekben „utoléri” a vírust, és itt már sikeresen lokalizálja. Legerősebben a C461A vírus esetén indukálódik a rezisztencia, hiszen itt egyetlen esetben sem figyeltünk meg szisztemikus tüneteket, tehát a vírus „megszökését”. Ezek az esetek jól mutatják, hogy egy fertőző vírus különböző növényi válaszreakciókat indukálhat, akár különböző biokémiai utak is versenyezhetnek egymással, amelyek kölcsönösen hatással lehetnek egymásra.

Mint minden tudományos kutatás, az uborka mozaik vírus-gazdanövény kapcsolatok vizsgálata is egy folyamat része, mely korábbi eredményekre épül, és

egyúttal alapját képezi további kutatásoknak. Az itt leírt munkák sok kérdésre választ adtak, bizonyos tünettípusok genetikai determinánsait sikeresen azonosítottuk, de sok újabb kérdés is felvetődött, elsősorban a fertőzött növényben kialakuló vírusfehérje-növényi fehérje kölcsönhatásokkal illetve az itt lejátszódó válaszreakciókkal kapcsolatban, ami a további kutatások kiindulópontja lehet.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi vírusok elleni védekezéshez a vírusfertőzés folyamatának megértése, a vírus-gazdanövény kapcsolatok megismerése elengedhetetlen. Vizsgálataink ezeket az alapvető ismereteket bővítették az elmúlt évek során.

Különböző uborka mozaik vírus izolátumok (R-CMV, Trk7-CMV, Rs-CMV, Ns-CMV) felhasználásával két esetben sikerült jellemző tünetek genetikai determinánsát vírusfehérjék egyetlen aminosavához kötnünk. Az egyik esetben a köpenyfehérje, míg másik esetben az 1a fehérje egy-egy aminosavára lokalizáltuk a jellemző tünetekért felelős determinánst.

Az első esetben a *N. glutinosa* növénynél az R-CMV által indukált törülésről bizonyítottuk, hogy a köpenyfehérje 193-as aminosavának megváltoztatása önmagában képes ezt a tünetet indukálni. Amennyiben ebben a pozícióban poláris, de töltéssel nem rendelkező oldalláncú aminosav helyezkedik el (szerin, aszparagin) kialakul a törpülés, míg pozitív töltésű oldallánc esetén (lizin) mozaik tünetek jelentkeznek. A tünetek kialakulásában szerkezeti vizsgálataink alapján a köpenyfehérje foszforiláltsági állapotának van szerepe.

A másik esetben az Ns-CMV különleges patológiai jellegéért felelős aminosavat az 1a fehérje 461-es aminosavára lokalizáltuk. Ez az izolátum a legtöbb CMV-től eltérően hiperszenzitív válaszreakciót indukált *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és *N. glutinosa* tesztnövényeken. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy nemcsak az Ns-CMV 1a fehérjében jelenlévő cisztein aminosav indukálja a különleges patológiai jellemzőket, hanem a szerin és az alanin aminosavak beépítése ugyanebbe a pozícióba szintén a vírus lokalizációjához vezet. Ugyanakkor az 1a fehérje 461-es pozíciójába prolint, aszparagint vagy glutaminsavat építve a vírus replikációja megszűnik. A 461. aminosav elhelyezkedését vizsgálva megállapítottuk, hogy ez a vírusfertőzésben több szempontból kulcsfontosságú rész az 1a fehérje egy amfipatikus  $\alpha$ -hélix részén helyezkedik el. A mutáns vírusok további vizsgálata azt is bizonyította, hogy a növény válaszreakciójában a vírusfertőzés során a fertőző inokulum koncentrációjának fontos szerepe van, valamint, hogy egyes esetekben a nekrotikus válaszreakció és a vírus lokalizációja szétválasztható.



Természetesen a vírushatás során ritkábbak az ilyen esetek, amikor egyetlen vírusfehérje egyetlen aminosavára lokalizálhatók a megjelenő tünetek. Az esetek többségében a fertőzés kialakulásához a vírusfehérjék funkcionálisan fontos részeinek egymással, illetve a gazdanövény fehérjével illetve nukleinsavaival való kölcsönhatása vezet.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a köpenyfehérje  $\beta$ B- $\beta$ C hurok részében elhelyezkedő három aminosavnak kulcsszerepe van a vírus hosszú távú mozgásában uborka növény esetén, azonban nem ez az egyetlen köpenyfehérje régió, ami a vírus hosszú távú mozgásában szerepet játszik ennél a gazdanövényenél. Ugyancsak bemutattuk, hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedésének alapfeltétele a mozgási fehérje karboxi-terminális részének kompatibilitása a köpenyfehérje karboxi-terminális kétharmadával. A szélesebb gazdanövénykörrel rendelkező CMV mozgási fehérjéje rugalmasabb a TAV mozgási fehérjéjénél, aminek szerepe lehet a vírus elterjedtségében is.

Munkánk során bemutattuk azt is, hogy a CMV mozgási fehérjéje helyettesíthető egy másik vírusszaládba tartozó vírus (CymRSV) mozgási fehérjéjével. Ez a rekombináns vírus életképes, de az általa indukált tünetekre és a szisztémikus terjedésre alapvető, a gazdanövénytől függő hatással van az idegen mozgási fehérje megjelenése.

A mezőgazdasági területeken, illetve természetes ökoszisztémában jelenlévő vírusoknak napjainkban csak egy része ismert és jól jellemzett, ugyanakkor ezek a vírusok is folyamatosan alkalmazkodnak a változó környezethez. Munkánk során a földimogyoró satnyulás vírus egy régóta ismert patotípusának a molekuláris jellemzését is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a Pannon ökorégió területén az akácról származó PSV izolátumok egy jól elkülönülő, új alcsoportot, a IV. alcsoportot alkotják. Ennek az alcsoportnak a kialakulásában RNS rekombináció szerepet játszott, majdnem a teljes köpenyfehérje kicserélődött a II. és III. alcsoport között. A rekombináció szerepet játszhatott az akáchoz, mint gazdanövényhez történő alkalmazkodás folyamatában.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottuk, hogy az uborka mozaik vírus R izolátuma által okozott törpülésszerű tünetek kialakításáért *N. glutinosa* növényen a köpenyfehérje 193-as aminosava a felelős. Ha ebben a pozícióban aszparagin vagy szerin található, a törpülésszerű tünetek kialakulnak, míg lizin jelenléte esetén mozaik tünetek alakulnak ki. A tünetek kialakulásában a molekula modellezés alapján a köpenyfehérje foszforilációs állapotának változása játszik szerepet.
2. Megállapítottuk, hogy a CMV szisztemikus terjedésében a  $\beta$ B- $\beta$ C hurok régió 78., 79. és 80. aminosava játszik kulcsszerepet uborka növények esetén. Az uborkát szisztemikusan nem fertőző TAV hosszú távú mozgásának kialakításához ennek a régióknak a módosítása nem elég, így a hosszú távú mozgásban egyéb köpenyfehérje régióknak is meghatározó szerepe van.
3. Igazoltuk, hogy a cucumovírusok sejtről-sejtre terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása. Ehhez a kompatibilitáshoz egyrészt a mozgási fehérje karboxi-terminális 30 (TAV) illetve 29 (CMV) aminosava, illetve a köpenyfehérje karboxi-terminális 150 aminosava szükséges. Megállapítottuk, hogy a kompatibilitás kialakulása során a CMV MP kevésbé specifikus, mint a TAV MP, és ez a rugalmasság hozzájárulhat a CMV szélesebb gazdanövényköréhez illetve elterjedéséhez.
4. Azonosítottunk a köpenyfehérje felszínén egy zsebet, melynek töltéseloszlása a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez kulcsfontosságú.
5. Bizonyítottuk, hogy a CMV mozgási fehérjéje heterológ (CymRSV eredetű) mozgási fehérjével helyettesíthető, és az így keletkező vírus fertőzőképes. Megállapítottuk, hogy a heterológ mozgási fehérje jelentősen módosíthatja

a CMV-re jellemző tüneteket. Csak lokálisan fertőződő gazdanövények esetén meghatározza a lokális léziók méretét, jellegét, míg mindkét szülő által szisztemikusan fertőződő gazdanövények esetén módosítja a vírusfertőzés tüneteit. Csak a CMV által szisztemikusan fertőzött gazdanövényeknél nem minden esetben marad meg a vírus szisztemikus terjedése, így a MP-nek a vírus hosszú távú mozgásában is fontos szerepe van.

6. Elsőként állapítottuk meg, hogy a PSV evolúciójában a rekombináció fontos szerepet játszott.
7. Leírtuk a PSV negyedik alcsoportját, mely alcsoport típusörzse a hazánkban akácon előforduló Rp-PSV.
8. Bizonyítottuk, hogy a Pannon ökorégió területén, akác növényen a IV. alcsoport PSV izolátumai vannak jelen.
9. Igazoltuk, hogy az Ns-CMV különleges patológiai tulajdonságaiért az 1a fehérje 461-es aminosava a felelős. Megállapítottuk, hogy ez az aminosav egy amfipatikus  $\alpha$ -hélix részét képezi, és az aminosav jellege alapvető fontosságú a vírusreplikációban és a tünetek típusának meghatározásában is.
10. Leírtuk, hogy a fertőző vírus koncentrációja kulcsfontosságú a növényi válaszreakció típusának meghatározásában.
11. Bizonyítottuk, hogy hiperszenzitív reakció esetén a vírus lokalizációja és a nekrotikus fenotípus szétválasztható.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

Abbink T.E., de Vogel J., Bol J.F. and Linthorst H. J. (2001). Induction of a hypersensitive response by chimeric helicase sequences of tobamoviruses U1 and Ob in N-carrying tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14:1086-1095.

Adams M.J. and Antoniw J.F. (2006). DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, Database issue, 34:382-385.

Argos P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 16:9909-9916.

Beczner L. and Devergne J.C. (1979). Characterization of a New Peanut Stunt Virus Strain Isolated from *Trifolium pratense* L. in Hungary. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 14:247-267.

Beczner L., Devergne J.C. and Vassányi R. (1978). Symptomatology and serological characterization of some Hungarian cucumovirus isolates. 3rd International Congress of Plant Pathology, München, Germany, 16-23 August, 1978

Bendahmane A., Kohn B.A., Dedi C. and Baulcombe D.C. (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant J.*, 8:933-941

Boccard F. and Baulcombe D. (1993). Mutational analysis of *cis*-acting sequences and gene function in RNA3 of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 193:563-578

Bonnet J., Fraile A., Sacristan S., Malpica J.M. and Garcia-Arena F. (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332:359-368.

Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S-W. and Baulcombe D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.*, 17:6739-6746.

Burgyán J., Hornyik Cs., Szittyá Gy., Silhavy D. and Bisztray Gy. (2000). The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J. Virol.*, 74:10873-10881.

Canto T. and Palukaitis P. (2001). A *Cucumber mosaic virus* (CMV) RNA 1 transgene mediates suppression of the homologous viral RNA 1 constitutively and prevents CMV entry into the phloem. *J. Virol.*, 75:9114-9120.

- Carrère I., Tepfer M. and Jacquemond M. (1999). Recombinants of *Cucumber mosaic virus* (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Arch. Virol.*, 144:365-79.
- Cawly J., Cole A.B., Király L., Qiu W. and Schoelz J.E. (2005). The plant gene CCD1 selectively blocks cell death during the hypersensitive response to Cauliflower mosaic virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18:212-9.
- Chen B. and Francki R.I.B. (1990). Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J. Gen. Virol.*, 71:939-944.
- Chen B., Randles J.W. and Francki R.I.B. (1995). Mixed-subunit capsids can be assembled in vitro with coat protein subunits from two cucumoviruses. *J. Gen. Virol.*, 76:971-973.
- Chen Y.K., Goldbach R. and Prins M. (2002). Inter- and intramolecular recombinations in the *Cucumber mosaic virus* genome related to adaptation to *Alstroemeria*. *J. Virol.*, 76:4119-4124.
- Choi S.K., Palukaitis P., Min B.E., Lee J.K., Choi J.K. and Ryu K.H. (2005). *Cucumber mosaic virus* 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *J. Gen. Virol.*, 86:1213-1222.
- Chu M., Park J. and Scholthof H.B. (1999). Separate regions of the *Tomato bushy stunt virus* p22 protein mediate cell-to-cell movement versus elicitation of effective resistance responses. *Mol. Plant Microbe Int.*, 4:285-292.
- Cillo F., Roberts I.M. and Palukaitis P. (2002). In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of *Cucumber mosaic virus* in tobacco and cucumber. *J. Virol.*, 76:10654-10664.
- Cole A.B., Király L., Ross K. and Schoelz J.E. (2001). Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14:31-41.
- Crawford K.M. and Zambryski P.C. (1999). Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statues. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:382-387.
- Crescenzi A., Barbarossa L., Gallitelli D. and Martelli G.P. (1993). *Cucumber mosaic cucumovirus* populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test. *Plant Dis.*, 77:28-33.
- Dalmay T., Rubino L., Burgyán J., Kollár Á. and Russo M. (1993). Functional analysis of *Cymbidium ringspot virus* genome. *Virology*, 194:697-704.

- Dalmay T., Rubino L., Burgyán J. and Russo M. (1992). Replication and movement of a coat protein mutant of *Cymbidium ringspot tombusvirus*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 5:379-383.
- Dangl J.L. and Jones J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826-833.
- Daniels J. and Campbell R.N. (1992). Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. *Plant Dis.*, 76:1245-1250.
- Dasgupta R., Garcia B.H. and Goodman R.M.(2001). Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98:4910-4915.
- Davies C. and Symons R.H. (1988). Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on *Cucumber mosaic virus* RNA3. *Virology*, 165:216-224.
- de Wispelaer M., Gaubert S., Trouilloud S., Belin C. and Tepfer, M. (2005). A map of the diversity of RNA3 recombinants appearing in plants infected with *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *Virology*, 331:117-127.
- den Boon J.A., Chen J. and Ahlquist P. (2001). Identification of sequences in *Brome mosaic virus* replicase protein 1a that mediate association with endoplasmic reticulum membranes. *J. Virol.*, 75:12370-81.
- Devergne J.C. and Cardin L. (1973). Contribution l'étude du virus de la mosaïque du concombre CMV. *Annual Phytopathology*, 5:409-430.
- Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.X. and Ding W. (2007). Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *The Plant Cell*, 19:2053-2063.
- Diaz-Ruiz J.R. and Kaper J.M. (1983). Nucleotide sequence relationship among thirty *Peanut stunt virus* isolates determined by competition hybridization. *Arch. Virol.*, 75:277-281.
- Ding B., Li Q., Nguyen L., Palukaitis P. and Lucas W.J. (1995). *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, 207:345-353.
- Ding S-W., Anderson B.J., Haase H.R. and Symons R.H. (1994). New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome. *Virology*, 198:593-601.

- Ding S-W., Li W.X. and Symons R.H. (1995b). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.*, 14:5762-5772.
- Doolittle S.P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6:145-147.
- Douine L., Quiot J.B., Marchoux G. and Archange P. (1979). Recensement des espèces sensibles au virus de la mosaïque du concombre (CMV). Etude bibliographique. *Ann. Phytopathol.*, 11:439-475.
- Du Z., Chen F., Zhao Z., Liao Q., Palukaitis P. and Chen J. (2008). The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of *Cucumber mosaic virus* subgroup I strains both play a role in viral RNA accumulation and induction of symptoms. *Virology*, 380:363-370.
- Edwardson J.R. and Christie R.G. (1991). Cucumoviruses *In*: CRC handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 293-319.
- Erickson F.L., Holzberg S., Calderon-Urrea A., Handley V., Axtell M., Corr C. and Baker B. (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J.*, 18:67-75.
- Escriu F., Fraile A. and García-Arenal F. (2000). Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*, 90:480-485.
- Escriu F., Fraile A. and García-Arenal F. (2007). Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PLoS Pathogenes*, 3 e8. doi:10.1371/s0030008.
- Finch J.T., Klug A. and Van Regenmortel M.H.V. (1967). The structure of *Cucumber mosaic virus*. *J. Mol. Biol.*, 24:303-305.
- Flasinski S., Scott S.W., Barnett O.W. and Sun W. (1995). Diseases of Peperomia, Impatiens, and Hibbertia caused by *Cucumber mosaic virus*. *Plant Dis.*, 79:843-848.
- Fraile A., Alonso-Prados J.L., Aranda M.A., Bernal J.J., Malpica J.M. and García-Arenal F. (1997). Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *J. Virol.*, 71:934-940.
- Fritzsche R., Lehmann, K.E. und Proesler G. (1972): Tierische vectoren pflanzenpathogener Viren. Fischer, Jena.
- Fulton R.W. (1953). Resistance in tobacco to *Cucumber mosaic virus* infection. *Phytopathology*, 43:472.

- Gabriel D.W. and Rolfe B. G. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:365-391.
- Gallitelli D. (2000). The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Res.*, 71:9-21.
- Gal-On A., Canto T. and Palukaitis P. (2000). Characterization of genetically modified *Cucumber mosaic virus* expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Arch. Virol.*, 145:37-50.
- Gal-On A., Kaplan I.B. and Palukaitis P. (1996). Characterization of *Cucumber mosaic virus*. II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology*, 226:354-361.
- Gal-On A., Kaplan I.B., Roossinck M.J. and Palukaitis P. (1994). The kinetics of infection of zucchini squash by *Cucumber mosaic virus* indicate a function for RNA1 in virus movement. *Virology*, 205:280-289.
- Gilardi P., Garcia-Luque I. and Serra M. T. (2004). The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in Capsicum. *J. Gen. Virol.*, 85:2077-2085.
- Gellért Á. and Balázs E. (2010). The solution structures of the cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus coat proteins explored with molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.*, 28:569-76.
- Gellért Á., Salánki K., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2006). Homology modelling and protein structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. *J. Mol. Graph. Model.*, 24:319-27.
- Gilson M.K., Sharp K.A. and Honig B. (1987). Calculating electrostatic interactions in biomolecules: Method and error assessment. *J. Comp. Chem.*, 9:327-335.
- Gonsales I., Martinez L., Rakitina D.V., Lewsey M.G., Atencio F., Llave C., Kalinina N.O., Carr J.P., Palukaitis P. and Canto T. (2010). *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: their significance and RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23:294-303.
- Goodman R.N., Király Z. and Wood K.R. (1986). The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, Columbia, MO. pp. 46-74.
- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P. and Blinov V.M. (1988). A novel superfamily of nucleotide triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.*, 235:16-24.



- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P. and Blinov V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.*, 17:4713-4730.
- Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T. and Masuta C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant and Cell Physiol.*, 48:1050-1060.
- Guex N. and Peitsch M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18:2714-2723.
- Guo H.S. and Ding S-W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.*, 21:398-407.
- Habili N. and Francki R.I.B. (1974). Comparative studies on *Tomato aspermy* and *Cucumber mosaic viruses*. I. Physical and chemical properties. *Virology*, 57:392-401.
- Hajimorad M.R., Hu C.C. and Ghabrial S.A. (1999). Molecular characterization of an atypical old world strain of *Peanut stunt virus*. *Archives of Virology*, 144:1587-1600.
- Hamamoto H., Watanabe Y., Kamada H. and Okada Y. (1997). A single amino acid substitution in the virus-encoded replicase of *Tomato mosaic tobamovirus* alters host specificity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10:1015-1018.
- Hampton R.O. and Francki R.I.B. (1992). RNA-1 dependent seed transmissibility of *Cucumber mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, 82:127-130.
- Havelda Z., Hornyik Cs., Crescenzi A. and Burgyán J. (2003). In situ characterization of *Cymbidium ringspot tobamovirus* infection-induced post transcriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.*, 77:6082-6086.
- Hayes R.J. and Buck K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell*, 63:363-368.
- Hearne P.Q., Knorr D.A., Hillman B.I. and Morris T.J. (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of *Tomato bushy stunt virus*. *Virology*, 177:141-151.
- Hellwald K.-H. and Palukaitis P. (1995). Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus*. *Cell*, 83:363-368.
- Hibi T. and Saito Y. (1985). A dot immunobinding assay for the detection of *Tobacco mosaic virus* in infected tissues. *J. Gen. Virol.*, 66:1191-1194.

- Higuchi R. Krummel B. and Saiki R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNS interactions. *Nucleic Acids Res.*, 16:7351-7367.
- Hollings M., Stone O.M. and Barton R.J. (1977). Pathology, soil transmission and characterisation of cymbidium ringspot, a virus from cymbidium orchids and white clover (*Trifolium repens*). *Ann. Appl. Biol.*, 85:233-248.
- Honig B. and Nicholls A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, 268:1144-1149.
- Horváth J. and Beczner L. (1983). Viruses of vegetable plants in Hungary and some of their properties. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. H.*, 18:237-254.
- Hu C.-C., Aboul-Ata A.E., Naidu R.A. and Ghabrial S.A. (1997). Evidence for the occurrence of two distinct subgroups of *Peanut stunt cucumovirus* strains: molecular characterization of RNA3. *J. Gen. Virol.*, 78:929-939.
- Hu C.C. and Ghabrial S.A. (1998). Molecular evidence that strain BV-15 of *Peanut stunt cucumovirus* is a reassortant between subgroup I and II strains. *Phytopathology*, 88:92-97.
- Hwang M.S., Kim S.H., Lee J.H., Bae J.M., Paek K.H. and Park YI. (2005). Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of *Cucumber mosaic virus*. *J. Gen. Virol.*, 86:3171-7.
- Hwang M.S, Kim K.N., Lee J.H. and Park Y.I. (2007). Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. *J. Gen. Virol.*, 88:3445-51.
- Ian, P.A., Rachel H.G., Wendy, A. M., Rick, N., Elena J., Meletele, N., Maria S. and Neil B. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10:537-545.
- Inaba J.I., Kim B.M., Shimura H. and Masuta C. (2011). Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiol.*, 156:2026-2036.
- Jacquemond M. et Lot H. (1981). L'ARN satellite di virus de la mosaïque du concombre. I. Comparaison de l'aptitude à induire la nécrose de la tomate d'ARN satellites isolés de plusieurs de virus. *Agronomie*, 1:927-932.
- Jagger I.C. (1916). Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, 6:148-151.

- Ji L.H. and Ding SW. (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe Int.*, 14:715-724.
- Joshi R. and Haenni A.L. (1986). Search for t-RNA like properties in *Tomato aspermy virus* RNS. *FEBS Lett.*, 194:157-194.
- Joshi R.L., Joshi S., Chapeville F. and Haenni A.L. (1983). tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *EMBO J.*, 2:1123-1127.
- Kadaré, G. and Haenni, A.L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71:2583-2590.
- Kamer G. and Argos P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent RNA polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.*, 12:7269-7282.
- Kaper J.M. and Waterworth H.E. (1981). In „Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis“ (E. Kurstake, ed), pp 257-332. Elsevier, Amsterdam, New York.
- Kaplan I.B., Gal-On A. and Palukaitis P. (1997). Characterization of *Cucumber mosaic virus*. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology*, 230:343-9.
- Kaplan I.B., Shintaku M.H., Li Q., Marsh L.E. and Palukaitis P. (1995). Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the *Cucumber mosaic virus* 3a gene. *Virology*, 209:188-199.
- Kaplan I.B., Zhang L. and Palukaitis P. (1998). Characterization of *Cucumber mosaic virus*. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology*, 246:221-231.
- Karasawa A., Okada I., Akashi K., Chida Y., Hase S., Nakazawa-Nasu Y., Ito A. and Ehara Y. (1999). One amino acid change in *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase determines virulent/avirulent phenotypes on cowpea. *Phytopathology*, 89:1186-1192.
- Keen N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.*, 24:447-463.
- Kim C.H. and Palukaitis P. (1997). The plant defense response to *Cucumber mosaic virus* in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J.*, 16:4060-4068.

Kim M.J., Ham B.K. and Paek K.H. (2006). Novel protein kinase interacts with the *Cucumber mosaic virus* 1a methyltransferase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340:228-235.

Kim S.H., Palukaitis P. and Park Y.I. (2002). Phosphorylation of *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.*, 21:2292-2300.

Kobori T., Miyagawa M., Nishioka K., Ohki S.T. and Osaki T. (2003). Amino acid 129 of *Cucumber mosaic virus* coat protein determines local symptom expression and systemic movement in *Tetragonia expansa*, *Momordica charantia* and *Physalis floridana*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 68:81-88.

Kohl R.J. and Hall T.C. (1974). Aminoacylation of RNA from several viruses: amino acid specificity and differential activity of plant yeast and bacterial synthetases. *J. Gen. Virol.*, 25:257-61.

Kong F., Sivakumaran K. and Kao C. (1999). The N-terminal half of the *Brome mosaic virus* 1a protein has RNA capping-associated activities: Specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology*, 259:200-210.

Kroner P. and Ahlquist P. (1992). RNA-based viruses. In: *Molecular plant pathology. A practical approach*. IRL Press, Oxford. Vol I, 23-24.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lakshman D.K. and Gonsalves D. (1985). Genetic analyses of two large-lesion isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology*, 75:758-762.

Lewsey M.G., Murphy A.M., McLean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G. and Carr J.P. (2010). Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Mol. Plant Microbe Int.*, 23:835-845.

Lewsey M.G., Robertson F.C., Canto T., Palukaitis P. and Carr J.P. (2007). Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J.*, 50:240-252.

Lewsey M.G., Surette M., Robertson F.C., Ziebell H., Choi S.H., Ryu K.H., Canto T., Palukaitis P., Payne T., Walsh J.A. and Carr J.P. (2009). The role of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22:642-654.

- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M. and Ding S-W. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO Journal*, 18: 2683–2691.
- Li Q. and Palukaitis P. (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of *Cucumber mosaic cucumovirus* and *Tobacco mosaic tobamovirus*. *Virology*, 216:71-79.
- Li Q., Ryu K.H. and Palukaitis, P. (2001). Cucumber mosaic virus–plant interactions: identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long-distance movement. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14:378–385.
- Liu S., He X., Park G., Josefsson C. and Perry K.L. (2002). A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for efficient aphid vector transmission. *J. Virol.*, 76:9756-9762.
- Llamas S., Moreno I.M. and García-Arenal F. (2006). Analysis of the viability of coat-protein hybrids between *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *J. Gen. Virol.*, 87:2085-2088.
- Lot H.W. and Kaper J.M. (1976). Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, 74:223-225.
- Lot H.W., Marrou J., Quiot J.B. et Esvan C. (1972). Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.*, 4:25-38.
- Lucas R.W., Larson S.B. Canady M.A. and McPherson A. (2002). The structure of *Tomato aspermy virus* by X-ray crystallography. *J. Struct. Biol.*, 139:90-102.
- Lucy A.P., Guo H.S., Li W.X. and Ding S.-W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.*, 19:1672-80.
- Masashi S., Megumi Y., Toshio Y. and Tadaaki H. (2003). Interaction of replicase components between *Cucumber mosaic virus* and *Peanut stunt virus*. *J. Virol.*, 84:1931–1939.
- Matthews R.E.F. (1991). *Plant Virology* 3rd edition Academic Press, New York. pp 423-469.
- McGarvey P., Tousignant M., Geletka L., Cellini F. and Kaper J.M. (1995). The complete sequence of a *Cucumber mosaic virus* from *Ixora* that is deficient in the replication of satellite RNAs. *J. Gen. Virol.*, 76:2257-2270.

- Militao V., Moreno I., Rodriguez-Cerezo E. and Garcia-Arenal F. (1998). Differential interactions among isolates of peanut stunt cucumovirus and its satellite RNA. *J. Gen. Virol.*, 79:177-184.
- Milne I., Wright F., Rowe G., Marshall D.F., Hushmeier D. and McGuire G. (2004). TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, 20:1806-1807.
- Mink G.I. (1972). *Peanut stunt virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses no. 92.
- Mink G.I., Hebert T.T. and Silbernagel M.J. (1967). A strain of *Peanut stunt virus* isolated from beans in Washington. *Phytopathology*, 57:1400.
- Mink G.I., Silbernagel M.J. and Saksena K.N. (1969). Host range, purification, and properties of the western of the peanut stunt virus. *Phytopathology*, 59:1625-1631.
- Mise K., Allison R.F., Janda M. and Ahlquist, P. (1993). Bromovirus movement protein genes play a crucial role in host specificity. *J. Virol.*, 67:2815-2823.
- Mochizuki T. and Ohki S.T. (2011). Single amino acid substitutions at residue 129 in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* affect symptoms expression and thylakoid structure. *Arch. Virol.*, 156:881-886.
- Moreno I.M., Malpica J.M., Rodriguez-Cerezo E. and García-Arenal F. (1997). A mutation in *Tomato aspermy cucumovirus* that abolishes cell-to-cell movement is maintained to high levels in the viral RNA population by complementation. *J. Virol.*, 71:9157-9162.
- Mossop D.W. and Francki R.I.B. (1978). Survival of satellite RNA *in vivo* and its dependence on *Cucumber mosaic virus* for replication. *Virology*, 86:562-566.
- Mushegian A.R. and Koonin E.V. (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses. *Arch. Virol.*, 133:239-257.
- Nagano H., Okuno T., Mise K. and Furusawa I. (1997). Deletion of the C-terminal 33 amino acids of *Cucumber mosaic virus* movement protein enables chimeric *Brome mosaic virus* to move from cell to cell. *J. Virol.*, 71:2270-2276.
- Naidu R.A., Hu C-C., Pennington R.E. and Ghabrial S.A. (1995). Differentiation of eastern and western strains of *Peanut stunt cucumovirus* based on satellite RNA support and nucleotide sequence homology. *Phytopathology*, 85:502-507.
- Nagy J.I. and Maliga P. (1976). Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 78:453-455.

- Náray-Szabó G. (1993). Analysis of molecular recognition: steric electrostatic and hydrophobic complementarity. *J. Mol. Recognit.*, 6:205-210.
- Nasu Y., Karasawa A., Hase S. and Ehara Y. (1996). *Cry*, the resistance locus of cowpea to *Cucumber mosaic virus* strain Y. *Phytopathology*, 86:946-951.
- Nejdat A.F., Cellier C. A., Holt R., Gafny A., Eggenberger L. and Beachy R. N. (1991). Transfer of the movement protein gene between two tobamoviruses: influence on local lesion development. *Virology*, 180:318-326.
- Netsu O., Hiratsuka K., Kuwata S., Hibi T., Ugaki M. and Suzuki, M. (2008). *Peanut stunt virus* 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Arch. Virol.*, 153:1731-1735.
- Nicholls A., Sharp K. and Honig B. (1991). Protein folding and association - insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins, Structure, Function and Genetics*, 11:281-296.
- Nitta A., Takanami Y., Kuwata S. and Susumu K. (1988). Inoculation with RNAs 1 and 2 of *Cucumber mosaic virus* induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.*, 69:2695-2700.
- Oparka K.J., Boevnik P. and Santa-Cruz S. (1996). Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.*, 1:412-418.
- O'Reilly E.K., Tang N., Ahlquist P. and Kao C.C. (1995). Biochemical and genetic analyses of the interaction between helicase-like and polymerase-like proteins of the *Brome mosaic virus*. *Virology*, 214:59-71.
- O'Reilly E.K., Whang Z., French R. and Kao C.C. (1998). Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *J. Virol.*, 72:7160-7169.
- Page R.D.M. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12:357-358.
- Palukaitis P. and García-Arenal F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62:241-323.
- Palukaitis P., Roossinck M.J., Dietzgen R.G. and Francki R.I.B. (1992). *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.*, 41:281-348.
- Peden K.W.C. and Symons R.H. (1973). *Cucumber mosaic virus* contains a functionally divided genome. *Virology*, 53:487-492.

- Perry K.L., Zhang L. and Palukaitis P. (1998). Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, 242:204-210.
- Perry K.L., Zhang L., Shintaku M.H. and Palukaitis P. (1994). Mapping determinants in *Cucumber mosaic virus* for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology*, 205:591-595.
- Pierrugues O., Guilbaud L., Fernandez-Delmond I., Fabre F., Tepfer M. and Jacquemond M. (2007). Biological properties and relative fitness of inter-subgroup *Cucumber mosaic virus* RNA 3 recombinants produced in vitro. *J. Gen. Virol.*, 88:2852-2861.
- Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C. and Bowman Vance V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, 9:859-68.
- Rao A.L.N. and Francki R.I.B. (1981). Comparative studies on *Tomato aspermy* and *Cucumber mosaic viruses*. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology*, 114:573-575.
- Requena A, Simon-Buela L., Salcedo G. and Garcia-Arenal F. (2006). Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of *Cucumber mosaic virus* particles. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19:734-746.
- Richter J., Haack M., Wesemann M. and Beczner L. (1987). Differentiation of *Peanut stunt virus* isolates in six serotypes. *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 2:127-133.
- Richter J., Proll E. and Musil M. (1979). Serological relationships between *Robinia* mosaic, clover blotch and peanut stunt viruses. *Acta Virologica*, 23:489.
- Rietveld K., Pleij C.W.A. and Bosch L. (1983). Three-dimensional models of the tRNA-like termini of some plant viral RNAs. *EMBO J.*, 2:1079-1085.
- Roosinck M.J., Bujarski J., Ding S.W., Hajimorad R., Hanada K., Scot S. and Tousignant M. (2006). Index of Viruses - Bromoviridae In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm).
- Roosinck M.J., Bujarski J., Ding SW., Hajimorad R., Hanada K., Scott S. and Tousignant M. (1999a). Family *Bromoviridae*. In: M.H.V. van Regenmortel, C. M. Fauquet and D.H.L. Bishop (szerk.), *Virus Taxonomy-Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California. pp. 923-935.



- Roossinck M.J., Kaplan I. and Palukaitis P. (1997). Support of *Cucumber mosaic virus* satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. *J. Virol.*, 73:6752-6758.
- Roossinck M.J. és Palukaitis P. (1990). Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA-1 of *Cucumber mosaic virus*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 3:188-192.
- Roossinck M.J., Zhang L. and Hellwald K.H. (1999b). Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.*, 73:6752-6758.
- Rozanov M.N., Koonin E.V. and Gorbalenya A.E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain - a hallmark of the Sindbis-like supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 73:2129-2134.
- Rubino L. and Russo M. (1998). Membrane targeting sequences in tombusvirus infections. *Virology*, 252:431-437.
- Russo M., Burgyán J. and Martelli P.G. (1994). The molecular biology of tombusviridae. *Adv. Vir. Res.*, 44:382-424.
- Ryabov E.V., Roberts I.A., Palukaitis P. and Taliansky M. (1999). Host-specific cell-to-cell and long-distance movement of *Cucumber mosaic virus* are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus. *Virology*, 260:98-108.
- Ryu K.H., Kim C-H. and Palukaitis P. (1998). The coat protein of *Cucumber mosaic virus* is a host range determinant for infection of maize. *Mol. Plant Microbe Int.*, 11:351-357.
- Salamon P., Molnár A. and Beczner L. (1976). *Capsicum annum* L. Increasing importance of some recently isolated viruses in Hungary. In: *Plant Virology, Proceeding VIII Congress of Czechoslovak Plant Virologisa, Bratislava, Czechoslovakia*, pp 421-430.
- Salamon P., Salánki K., Szilassy D. és Balázs E. (1998). Az uborka mozaik vírus nekrotikus izolátumának (CMV-N) patológiai jellemzése. *Növényvédelem*, 34:583-591.
- Salánki K., Carrère I., Jacquemond M., Balázs E. and Tepfer M. (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with *Cucumber mosaic virus* and *tomato aspermy virus*. *J. Virol.*, 71:3597-3602.
- Sali A. (1995). Modeling mutations and homologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6:437-451.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.A. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Schmelzer K. (1971). *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, no 65.

Schmitz I. and Rao A.L.N. (1998). Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of *Cucumber mosaic virus* coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology*, 248:323-331.

Scholthof H.B., Desvoyes B., Kuecker J. and Whitehead E. (1999). Biological activity of two tombusvirus proteins translated from nested genes is influenced by dosage control via context-dependent leaky scanning. *Mol. Plant Pathogen Int.*, 12:670-679.

Scholthof H.B., Morris T.J. and Jackson A.O. (1993). The capsid protein gene of *Tomato bushy stunt virus* is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Mol. Plant Pathogen Int.*, 6:309-322.

Scholthof H. B., Scholthof K.B.G. and Jackson A.O. (1995). Identification of *Tomato bushy stunt virus* host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell*, 7:1157-1172.

Schulze-Lefert P. (2004). Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr. Biol.*, 14:22-24.

Seo J.K., Kwon S.J., Choi H.S. and Kim K.H. (2009). Evidence for alternate states of *Cucumber mosaic virus* replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, 383:248-260.

Shintaku M.H., Zhang L. and Palukaitis P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell*, 4:751-757.

Silhavy D., Molnár A., Lucioli A., Szittyá Gy., Hornyik Cs., Tavazza M. and Burgyán J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing generated 21-25 nt double-stranded RNAs. *EMBO J.*, 21:3070-3080.

Sivakumaran K., Bao Y., Roossinck M.J. and Kao C.C. (2000). Recognition of core promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicases of *Brome mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *J. Virol.*, 74:10323-10331.

Smith T.J., Chase E., Schmidt T. and Perry K.L. (2000). The Structure of *Cucumber mosaic virus* and Comparison to *Cowpea chlorotic mottle virus*. *J. Virol.*, 74:7578-7586.

- Solovyev A. G., Zelenina D. A., Savenkov E. I., Grdzlishvili V. Z., Morozov S. Y. U., Lesemann D.-E., Maiss E., Casper R. and Atabekov J. G. (1996). Movement of a *Barley stripe mosaic virus* chimera with a *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Virology*, 217:435-441.
- Stommel J.R., Tousignant M.E., Wai T., Pasini R. and Kaper J.M. (1998). Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to *Cucumber mosaic virus*. *Plant Dis.*, 82:391-396.
- Sugiyama M., Sato H., Karasawa A. Hase S., Takahashi H. and Ehara Y. (2000). I. Characterization of symptom determinants in two mutants of *Cucumber mosaic virus* Y strain, causing distinct mild green mosaic symptoms in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 56:85-90.
- Sunpapao A., Nakai T., Dong F., Mochizuki T. and Ohki S.T. (2009). The 2b protein of *Cucumber mosaic virus* is essential for viral infection of the shoot apical meristem and for efficient invasion of leaf primordia in infected tobacco plants. *J. Gen. Virol.*, 90:3015-3021.
- Suzuki M., Kuwata S., Kataoka J., Masuta C., Nitta N. and Takanami Y. (1991). Functional analysis of deletion mutants of *Cucumber mosaic virus* RNA3 using an *in vitro* transcription system. *Virology*, 183:106-113.
- Suzuki M., Kuwata S., Masuta C. and Takanami Y. (1995). Point mutations in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J. Gen. Virol.*, 76:1791-1799.
- Suzuki M., Yoshida M., Yoshinuma T. and Hibi T. (2003). Interaction of replicase components between *Cucumber mosaic virus* and *Peanut stunt virus*. *J. Gen. Virol.*, 84:1931-1939.
- Symons R.H. (1975). *Cucumber mosaic virus* RNA contains 7-methyl guanosine at the 5'-terminus of all four RNA species. *Mol. Biol. Rep.*, 2:277-285.
- Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999a). Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in *Cucumber mosaic cucumovirus*. *Virus Genes*, 18:221-227.
- Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999b). Stunting induced by *Cucumber mosaic cucumovirus*-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol. Plant Microbe Int.*, 12:1105-1113.
- Szirmai J. (1941). A fűszerpaprika leromlását megindító, újhitűségnek nevezett vírusbetegségről. *Növényegészségügyi Évk.*, 1941:110-133.

Szittyá Gy. and Burgyán J. (2001). *Cymbidium ringspot tombusvirus* coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. J. Virol., 75:2411-2420.

Takahashi H. and Ehara Y. (1993). Severe chlorotic spot symptoms in *Cucumber mosaic virus* strain Y-infected tobaccos are induced by a combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. Mol. Plant Microbe Int., 6:182-189.

Takahashi H., Sugiyama M., Sukamto, Karasawa A., Hase S. and Ehara Y. (2000). A variant of *Cucumber mosaic virus* is restricted to local lesions in inoculated tobacco leaves with a hypersensitive response. J. Gen. Virol., 66:335-344.

Takahashi H., Suzuki M., Natsuaki K., Shigyo T., Hino K., Teraoka T., Hosokawa D. and Ehara Y. (2001). Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in *Cucumber mosaic virus*-infected *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol., 42:340-347.

Talianski M.E. and García-Arenal F. (1995). Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. J. Virol., 69:916-922.

Taraporewala Z.F. and Culver J.N. (1996). Identification of an elicitor active site within the three-dimensional structure of the *Tobacco mosaic tobamovirus* coat protein. Plant Cell., 8:169-78.

Thompson JR, Doun, S. és Perry, K.L. (2006). Compensatory capsid protein mutations in *Cucumber mosaic virus* confer systemic infectivity in squash (*Cucurbita pepo*). J. Virol., 80:7740-7743.

Tomlinson J.A. (1987). Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. Annals of Appl. Biol., 110:661-681.

Vaquero C., Turner A.P., Demangeat G., Sanz A., Serra M.T., Roberts K. and García-Luque I. (1994). The 3a protein from *Cucumber mosaic virus* increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. J. Gen. Virol., 75:3193-3197.

Wahyuni W.S., Dietzgen R.G., Hanada K. and Francki R.I.B. (1992). Serological and biological variation between and within subgroup-I and subgroup-II strains of *Cucumber mosaic virus*. Plant Pathol., 41:282-297.

Wang Y.Z., Gaba V., Yang J., Palukaitis P. and Gal-On A. (2002). Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. Phytopathology, 92:51-58.

Weber H., Schultze S. és Pfitzner A. J. (1993). Two amino acid substitutions in the *Tomato mosaic virus* 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2(2) resistance gene in the tomato. J. Virol., 67:6432-6438.

Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A.U., Singh C., Ghio C., Alagona G., Profeta S. and Weiner P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:765-784.

White J.L. és Kaper J.M. (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *J. Virol. Meth.*, 23:83-94.

Wikoff W.R., Tsai C.J., Wang G., Baker T.S. és Johnson J.E. (1997). The structure of *Cucumber mosaic virus*: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis. *Virology*, 232:91-7.

Xin H.W., Ji L.H., Scott S.W., Symons R.H. és Ding S-W. (1998). Ilarviruses encode a Cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the Bromoviridae. *J. Virol.*, 72:6956-6959.

Xu Z., Barnett O.W. and Gibson P.B. (1986). Characterization of *Peanut stunt virus* strains by host reaction, serology, and RNA patterns. *Phytopathology*, 76:390-395.

Xu Z., Higgins C., Chen K., Dietzgen R.G., Zhang Z., Yan L. and Fang X. (1998). Evidence for a third taxonomic subgroup of *Peanut stunt virus* from China. *Plant Dis.*, 82:992-998.

Yan L.Y., Xu Z.Y., Goldbach R., Kunrong C., és Prins M. (2005). Nucleotide sequence analyses of genomic RNAs of *Peanut stunt virus* Mi, the type strain representative of a novel PSV subgroup from China. *Arch. Virol.*, 150:1203-1211.

Zhang L., Hanada K. and Palukaitis P. (1994). Mapping local and systemic symptom determinants of *Cucumber mosaic cucumovirus* in tobacco. *J. Gen. Virol.*, 75:3185-3191.

Zhang X., Yuan Y.R., Pei Y., Lin S.S., Tuschl T., Patel D.J. and Chua N.H. (2006). *Cucumber mosaic virus* -encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis argonaute1* cleavage activity to counter plant defense. *Genes and Dev.*, 20:3255-3268.

Zheng M.S., Takahashi H., Miyazaki A., Hamamoto H., Shah J., Yamaguchi I. és Kusano T. (2004). Up-regulation of *Arabidopsis thaliana* NHL10 in the hypersensitive response to *Cucumber mosaic virus* infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta*, 218:740-750.

Ziegler-Graff V., Guilford P.J. and Baulcombe D.C. (1991). *Tobacco rattle virus* RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology*, 182:145-55.

## 9. KÖZLEMÉNYEK

### A Phd fokozat megszerzése óta megjelent közlemények:

#### Az értekezés témaköréből megjelent közlemények jegyzéke:

Folyóiratban megjelent közlemények:

Salamon P., Salánki K., Szilassy D. és Balázs E. (1998): Az uborka mozaik vírus nekrotikus izolátumának (CMV-N) patológiai jellemzése. *Növényvédelem*, 34:583-591.

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Stunting symptom of Cucumber mosaic virus infected *Nicotiana glutinosa* plants is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol. Plant Microbe Int.*, 12:1105-1113.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. and Balázs E. (2002): Heterologous movement protein highly determinates the infection phenotype of Cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 76:3554-3557.

Salánki K., Gellért A., Huppert E., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2004): Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *J. Gen. Virol.*, 85(4):1039-1048.

Divéki Z., Salánki K. and Balázs E. (2004): The necrotic pathotype of the Cucumber mosaic virus (CMV) Ns strain is solely determined by the amino acid 461 of the 1a protein. *Mol. Plant Microbe Int.* 17(8):837-45.

Salánki K., Gellért Á. és Balázs E. (2006): Az uborka mozaik vírus változékonysága a köpenyfehérje-szerkezet tükrében. *Növényvédelem*, 42(1):15-22.

Gellért Á., Salánki K., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2006): Homology modelling and protein structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24(5):319-27.

Salánki K., Gellért A., Náray-Szabó G. and Balázs E. (2007): Modelling-based characterization of the elicitor function of amino acid 461 of cucumber mosaic virus 1a protein in the hypersensitive response. *Virology*, 358:109-117.

Kiss L., Balázs E. és Salánki K. (2008): Magyarországi fehér akácról (*Robinia pseudoacacia* L.) származó földmogyoró satnyulás vírus (Peanut stunt virus, PSV)-izolátumok jellemzése. *Növényvédelem*, 44(11): 573-578.

Kiss L., Sebestyén E., László E., Salamon P., Balázs E. and Salánki K. (2008): Nucleotide sequence analysis of Peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution. *Archives of Virology*, 153(7):1373-7.

Kiss L., Balázs E. and Salánki K. (2009): Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4):671-677.

Salánki K, Kiss L, Gellért A, Balázs E. (2011): Identification a coat protein region of cucumber mosaic virus (CMV) essential for long-distance movement in cucumber. *Arch. Virol.*, 156(12):2279-83.

Tudományos előadások, poszterek:

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Determinants of a host specific stunting symptom induced by Cucumber mosaic cucumovirus infection. XIth international congress of virology. Sydney, Australia 1999. August 9-13.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): Egy különleges patológiai tulajdonságú uborka mozaik vírus törzs (CMV-N) elsődleges szerkezetének jellemzése. 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2000. február 22-23.

Salánki K., Huppert E. és Balázs E. (2000): Cucumovírusok lokális terjedésének feltétele a 3a protein és a köpenyfehérje kölcsönhatása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2000. augusztus 24.-26.

Salánki K., Huppert E. és Balázs E. (2001): Cucumovírusok lokális terjedésének feltétele a mozgási fehérje és a köpenyfehérje kompatibilitása. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2001. február 27-28.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. és Balázs E. (2001): A mozgási fehérje kicserélése nem okozza az uborka mozaik vírus fertőzőképességének elvesztését. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2001. február 27-28.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2001): Uborka mozaik vírus nekrotikus törzsének (CMV-N) különleges patológiai tulajdonságaiért felelős genetikai determináns azonosítása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. és Balázs E. (2001): Hibrid uborka mozaik vírus előállítása nem homológ mozgási fehérje felhasználásával. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. október 10-12.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2002): Az uborka mozaik vírus Ns törzsének nekrozist okozó képessége a vírusgenom 1.RNS-éhez köthető. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2002. Március 6-7.

Huppert E., Szilassy D., Salánki K., Divéki Z. and Balázs E. (2002): Hybrid Cucumber mosaic virus moves efficiently with the movement protein of Cymbidium ringspot virus. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Salánki K., Huppert E., Gellért Á. and Balázs E. (2002): The compability of the 3A protein and the coat protei of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Divéki Z., Salánki K. and Balázs E. (2002): The genetic determinant responsible for the unique pathological properties of the Cucumber mosaic cucumovirus necrotis strain (CMV-N). XIIth International Congress of Virology, Paris, July 27- August 1 2002.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Huppert Emese, Náray-Szabó Gábor és Balázs Ervin (2004): A homológia modellezés legetősége a cucumovírusok sejtről sejtre való terjedésének vizsgálatában.. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004. május 10-13.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Huppert Emese, Náray-Szabó Gábor and Balázs Ervin (2004): Applied homology modelling in the study of cell-to-cell movement of cucumoviruses. 22nd European Cristallographic Meeting, Budapest, August 26-31 2004.

Salánki Katalin, Gellért Ákos and Balázs Ervin. (2005): Characterization of the 461 amino acid position of Cucumber mosaic virus 1a protein responsible for necrosis induction. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, July 22-28 2005.

Gellért Ákos, Salánki Katalin, Náray-Szabó Gábor and Balázs Ervin (2005): Homology modelling and structure based functional analysis of five cucumovirus coat proteins. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, July 22-28 2005.

Gellért Ákos, Salánki Katalin and Balázs Ervin (2005): Characterization of the 461 amino acid position of cucumber mosaic virus 1A protein responsible for necrosis induction. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica V52 P47 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, October 26-28 2005.



Salánki Katalin, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2006): Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus, CMV*) 1A fehérje 461. aminosavának szerepe a hiperszenzitív reakció kialakításában. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2006. február 23-24.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2006): Az uborka mozaik vírus szisztemikus terjedéséért felelős köpenyfehérje régió azonosítása uborka növényen. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2006. október 18-20.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2007): Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus, CMV*) szisztemikus terjedéséért a köpenyfehérje 78-80. aminosavai felelősek uborka növényen. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007 február 20-21.

Kiss László, Sebestyén Endre, László Emese, Salamon Pál, Balázs Ervin and Salánki Katalin (2007): Nucleotide sequence analysis of Peanut stunt virus RP isolate, prove the role of recombination in cucumovirus evolution. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2007 July 18-20.

Kiss László, Sebestyén Endre, László Emese, Salamon Pál, Balázs Ervin és Salánki Katalin (2008): *In vivo* rekombináns földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*) izolátum molekuláris jellemzése. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28.

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos and Balázs Ervin (2008): Identification of a region of *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein responsible for long-distance movement deficiency in cucumber XIVth International Congress of Virology, Istanbul, 2008 augusztus 10-15.

Kiss L., Sebestyén E., László E., Salamon P., Baláz, E. and Salánki K. (2008): Molecular characterization of a black locust strain of Peanut stunt virus, The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (August 20-23, Ljubljana, Slovenia) 61.

Kiss L., Balázs E. és Salánki, K. (2009): Pannon ökorégióból származó földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus, PSV*) izolátumok jellemzése. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009 február 23-24.

**A dolgozathoz nem, vagy nem közvetlenül kapcsolódó közlemények jegyzéke:**

Folyóiratban megjelent közlemények:

Szász A., Szilassy D., Salánki K., Fári M. and Balázs, E. (1998): A simple and efficient method for the transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Agron.*, 46:201-207.

Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in cucumber mosaic virus. *Virus Genes*, 18:221-227.

Teycheney P.Y., Aaziz R., Tourneur C., Salánki K., Dinant S., Balázs E., Jacquemond M. and Tepfer M. (2000): Synthesis of (-)-strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.*, 81:1121-1126.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): A GFP riportergén alkalmazása a Cucumovírusok mozgásának tanulmányozásában. *Növényvédelem*, 36(7):343-8

Salamon P. és Salánki K. (2001): Termesztett és vadon élő burgonyafélék vírusbetegségei és vírusai Magyarországon. 4. Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) spontán előfordulása farkasbogyón (*Scopolia carniolica* Jacq.). *Növényvédelem*, 37(3):123-128.

Salamon P. és Salánki K. (2002): A napraforgó (*Helianthus Annus* L.) gyűrűs mozaik betegsége: Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) által okozott új betegség előfordulása Magyarországon. *Növényvédelem*, 38(1):9-21.

Divéki Z., Salánki K. és Balázs E. (2002) Limited utility of blue fluorescent protein (BFP) in monitoring plant virus movement. *Biochimie*, 84(10): 997-1002.

Tóbiás I., Szabó B., Salánki K. és Palkovics L. (2007): A cukkini sárga mozaik vírus és az uborka mozaik vírus terjedése a héj nélküli tök (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) magjával. *Növényvédelem*, 43(7):291-300.

Tóbiás István, Kiss Balázs, Pájtli Éva, Tholt Gergely és Salánki Katalin (2008): A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus) árpatorzsének jellemzése és átviteli kísérletek. *Növényvédelem*, 44(11):545-552.

Kiss L, Salánki K, Csilléry G, Szarka J és Palkovics L (2008): Az L3 rezisztencia sem elég már. *Kertészet és Szőlészet*, 57(22):12-13.

Balázs E., Bukovinszki Á, Csányi M, Csilléry G, Divéki Z., Nagy I, Mitykó J, Salánki K and Mihálka V. (2008): Evaluation of a wide range of pepper genotypes for regeneration and transformation with an *Agrobacterium tumefaciens* shooter strain. *South African Journal of Botany*, 74:720-725.

Tóbiás István, Almási Asztéria, Salánki Katalin és Palkovics László (2009): A kabakosokon 2008-ban végzett virológiai vizsgálat eredményei. *Növényvédelem*, 45(5):241-244.

Tóbiás I., Kiss B., Salánki K. and Palkovics L. (2010): The nucleotide sequence of barley strain of Wheat dwarf virus isolated in Hungary. *Cereal Research Communications*, 38(1):67-74.

Salamon Pál, Várallyay Éva, Nemes Katalin és Salánki Katalin (2010): Termesztett és vadon élő burgonyafélék vírusos betegségei és vírusai Magyarországon. 7. Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus) fehér törzsének előfordulása dohányon (*Nicotiana tabacum* L.) és a CMV-NTW izolátum tulajdonságai. *Növényvédelem*, 46(5):218-225.

Tóbiás István, Shevchenko Oleksiy, Kiss Balázs, Bysov Andriy, Snihur Halina, Polischuk Valery, Salánki Katalin and Palkovics, László (2011): Comparison of the nucleotide sequences of Wheat dwarf virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine. *Polish Journal of Microbiology*, 60(2):125-131.

Salamon P., Nemes K., Salánki K. and Palkovics L. (2012): First report of natural infection of pea (*Pisum sativum* L.) by Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Hungary. *Plant Disease*, 96(2):295.

Kádár Katalin, Salánki Katalin, Gellért Ákos, Divéki Zoltán, Balázs Ervin (2011): Olajtőkről izolált uborka mozaik vírus molekuláris jellemzése. *Növényvédelem*, 47(9):357-362.

Tóbiás István, Kiss Balázs, Salánki Katalin és Palkovics László (2011): A búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*) etiológiai vizsgálata és molekuláris jellemzése. *Növényvédelem*, 47(9):371-376.

#### Könyvfejezet:

Jacquemond M., Salánki K., Carrère I., Balázs E. and Tepfer M. (1997): Behaviour of cucumovirus pseudorecombinant and recombinant strains in solanaceous hosts. In: *Virus-resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Ed. Tepfer M., Balázs E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, INRA Paris, pp. 52-65.

Balázs E., Huppert E., Divéki Z. és Salánki K. (2006): A paprika fontosabb hazai víruskórokozói. In: Étkezési és fűszerpaprika termesztése. Ed.: Zatykó L. és Márkus F. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp164-173.

Tudományos előadások, poszterek:

Szilassy D., Józsa R., Palkovics L., Salánki K., Wittner A., Szász A. and Balázs, E. (1997): Coat protein mediated cross protection in different plant virus interactions. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Hungary, 17-21 August.

Huppert E., Salánki K., Szilassy D. és Balázs E. (1998): Paradicsom magtalanság vírus (TAV-P) egyes és kettős RNS-ének molekuláris jellemzése. 44. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 1998

Aaziz R., Salánki K., Baláz, E., Jacquemond M. and Tepfer M. (1998): Strategies for detection of recombination in virus infected plants expressing a viral transgene. 5th International Symposium The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Braunschweig, Germany 1998

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (1999): Monitoring the movement of RNA viruses in plant tissue: the role of Tomato aspermy cucumovirus (TAV, Bromoviridae) coat protein in cell-to-cell movement. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, August 29-September 1, 1999.

Salamon P., Salánki K. és Szilassy D. (2000): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus) spontán előfordulása ricinuson (*Ricinus communis* L.) és farkasbogyón (*Scopolia carniolica* Jacq.). 46. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2000. február 22-23.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. and Balázs E. (2000): Different expression level of green fluorescein protein (GFP) variants in several *Nicotiana* species. EMBO workshop „ Plant virus invasion and host defence” Kolymbari, Crete, Greece, May 28- June 1, 2000.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K., Balázs E.(2000): Studying the use of green fluorescent protein (GFP) variants in plant systems. 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, Canada, June 18-24.

Divéki Z., Szilassy D., Salánki K. és Balázs E. (2000): A zöld fluoreszcens fehérje (GFP) - kék fluoreszcens fehérje (BFP) kettős jelölési rendszer optimalizálása növényekben. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2000. augusztus 24.-26.

Salamon P. és Salánki K. (2000): Az uborka mozaik vírus (CMV, cucumber mosaic virus) és a tarlórépa mozaik vírus (TuMV, Turnip mosaic virus) előfordulása retken (*Raphanus sativus* L.). „Lippay János - Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, 2000. november 6-7.

Salamon Pál, Gajdos Lajos, Varró P, Kiss László és Salánki Katalin. (2005): Uborka mozaik vírus (CMV, *Cucumber mosaic virus*) rezisztencia paprika (*Capsicum annum* L.) genotípusokban: a rezisztencia jellege és beépítése új paprika vonalakba. 10. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen, 2005. október 18-20.

Salamon Pál, Gajdos Lajos, Balogh P, Solymoss E, Varró P, Milotay P, Kiss László és Salánki Katalin (2005): Virulens uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) törzs izolálása bogyóelhalás tünetet mutató paradicsomból (*Lycopersicon esculentum* MILL.) Lippay János Tudományos Ülésszak, Budapest, 2005. október 20-21.

Kiss László, Salánki Katalin, Csilléry Gábor és Palkovics László (2007): A Paprika enyhe tarkulás vírus (Pepper mild mottle virus, PMMoV L3 rezisztenciát áttörő patotípusának megjelenése magyarországon, a kórokozó molekuláris jellemzése. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007 február 20-21.

Tóbiás István, Szabó Béla, Salánki Katalin, Sári László, Hubert Kulhmann és Palkovics László (2008): A héj nélküli tök (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) magjával terjedő vírusok azonosítása. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28

Nemes Katalin, Kiss László, Csilléry Gábor és Salánki Katalin (2008): Paprikát fertőző vírusok kimutatása multiplex-PCR technikával. 54. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2008 február 27-28.

Tóbiás I., Kiss B., Pájtó É., Tholt G. és Salánki K. (2009): A búza törpülés vírus (*wheat dwarf virus*) árpáról izolált törzseinek jellemzése és átviteli kísérletek. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2009 február 23-24.

Salamon P., Nemes K. és Salánki K. (2009): Paradicsom foltos hervadás vírus (tomato spotted wilt virus, TSWV) a borsó (*Pisum sativum* L.) új kórokozója Magyarországon. “Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, 2009. október 28-30.

Salamon P., Nemes K. és Salánki K. (2010): Paradicsom foltos hervadás vírus (tomato spotted wilt virus, TSWV) rezisztencia törő törzsének első izolálása paprikáról (*Capsicum annum* L.) Magyarországon. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2010. február 23-24.

Tóbiás István, Oleksij Shevchenko, Kiss Balázs, Andrij Bysov, Salánki Katalin, Nonka Bakardjieva, Tholt Gergely és Palkovics László (2011): A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus) variabilitása Európában. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p26.

Nemes Katalin és Salánki Katalin (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) replikáz fehérje karboxi-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p74.

Kádár Katalin, Divéki Zoltán, Gellért Ákos, Salánki Katalin és Balázs Ervin (2011): Olajtökről izolált uborka mozaik vírus (CMV) jellemzése. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p29.

Nemes Katalin, Gellért Ákos, Balázs Ervin és Salánki Katalin (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) 2b fehérjéjének funkcionális analízise. 57. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 21-22. p30.

Katalin Nemes, Ákos Gellért, Ervin Balázs and Katalin Salánki (2011): Functional analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. APS-IPPC Joint Meeting, Honolulu, Hawaii, U.S.A. August 6 - 10.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Balázs Ervinnek, az MTA tagjának, akinek sokáig a csoportjában dolgozhattam, és máig szoros munkakapcsolatban dolgozunk. Mindig segítette, és messzemenőig támogatta munkámat. Pályám elejétől kezdve biztatott az önálló kutatási irány megtalálására, és a mind újabb technikák alkalmazására a növényvirologia területén.

Szeretném megköszönni szerzőtársaimnak és a Virologia laboratórium hallgatóinak: Dr. Divéki Zoltánnak, Dr. Huppert Emesének, Dr. Gellért Ákosnak, Kádár Katalinnak, Dr. Kiss Lászlónak, László Emesének, Náray-Szabó Gábor akadémikusnak, Nemes Katalinnak, Dr. Salamon Pálnak, Dr. Sebestyén Endrének, Dr. Szilassy Dénesnek, a mindennapi jó hangulatú közös munkát.

Salamon Pálnak külön köszönöm a fényképek folyamatos, és kitűnő minőségű készítését, mely nélkülözhetetlen volt a különböző munkák dokumentálása során.

Köszönettel tartozom a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont korábbi és jelenlegi vezetésének, hogy biztosította munkámhoz a feltételeket.

Szeretném megköszönni Náduduvariné Novák Júlia, majd Sztánáné Keresztúri Erika gondos és lelkiismeretes technikai segítségét.

Családomnak, férjemnek Dr. Palkovics Lászlónak köszönöm a segítséget a dolgozatom elkészítése során, valamint Neki és fiaimnak Áronnak és Bencének köszönöm a türelmet és megértést ami nélkülözhetetlen volt az elmúlt évek munkájához éppúgy, mint a dolgozat elkészítéséhez.

Hálával és köszönettel tartozok szüleimnek, akik szeretetükkel és bizalmukkal mindig mellettem álltak és a kutatómunka iránti elhivatottságukkal példát mutattak.